

Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de la pasta CTZ y sus componentes sobre microorganismos estándar

Farli Aparecida Carrilho Boer¹ , Lucas Fernando Oliveira Tomáz Ferrareso¹ ,
Karina Tomoe Ajimura¹ , Regina Lúcia dos Santos² , Wanda Terezinha Garbelini Frossard³ .

Resumen: La pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinc y eugenol) se utiliza para tratar los molares decíduos con pulpa necrótica. Se evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana (AA) de diferentes concentraciones de los componentes de la pasta CTZ contra diferentes microorganismos. Los medicamentos se dividieron en 6 grupos: P1: 250 mg de tetraciclina + 250 mg de cloranfenicol + 500 mg de óxido de zinc (OZ) + 0,6 ml de eugenol (proporción original), P2: 500 mg de tetraciclina + 500 mg de OZ + 0,6 ml de eugenol, P3: 500 mg de cloranfenicol + 500 mg de OZ + 0,6 ml de eugenol, P4: 1000 mg de OZ + 0,6 ml de eugenol, P5: 0,006 ml de eugenol, P6: 1000 mg de OZ + solución salina (0,85%) y evaluado contra microorganismos estándar individualmente: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Se aplicaron pruebas de difusión en agar (PDA) y exposición directa (PED). Los datos fueron sometidos a ANOVA y prueba de Tukey ($p < 5$). El grupo P1 tenía mayor AA en comparación con otros grupos. Para *Escherichia coli*, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos P1 y P3. PED demostró AA para los grupos P1, P2, P3, P4 y P5 en los intervalos de tiempo evaluados e ineficacia para P6 debido a la ausencia de eugenol. El grupo P1 presentó el AA más alto entre los grupos del PDA. PED demostró AA en grupos con eugenol en su composición, lo que sugiere efecto bactericida.

Palabras clave: Antiinfecciosos, Caries Dental, Eugenol, Materiales de Obturación del Conducto Radicular, Óxido de Zinc.

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta CTZ e seus componentes sobre microrganismos padrões

Resumo: A pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol) é utilizada para o tratamento de molares decíduos com polpa necrótica. Avaliou-se *in vitro* a atividade antimicrobiana (AA) de diferentes concentrações dos componentes da pasta CTZ contra diferentes microorganismos. Os medicamentos foram divididos em 6 grupos: P1: 250 mg de tetraciclina + 250 mg de cloranfenicol + 500 mg de óxido de zinco (OZ) + 0,6 ml de eugenol (proporção original), P2: 500 mg de tetraciclina + 500 mg de OZ + 0,6 ml de eugenol, P3: 500 mg de cloranfenicol + 500 mg de OZ + 0,6 ml de eugenol, P4: 1000 mg de OZ + 0,6 ml de eugenol, P5: 0,006 ml de eugenol, P6: 1000 mg de OZ + solução salina (0,85%), e avaliados contra microrganismos padrões individualmente: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Utilizou-se testes de difusão em ágar (TDA) e exposição direta (TED). Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey ($p < 5$). O grupo P1 teve maior AA comparativamente aos demais grupos. Para a avaliação da *Escherichia coli*, não observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos P1 e P3. TED demonstrou efetividade antimicrobiana para os grupos P1, P2, P3, P4 e P5 nos intervalos de tempo avaliados e inefetividade do P6 devido a ausência do eugenol. Conclui-se que o grupo P1 apresentou no TDA, a maior AA entre grupos. TED demonstrou AA nos grupos com eugenol em sua composição, o que sugere efeito bactericida desse componente.

Palavras-chave: Anti-Infeciosos; Cárie Dentária; Eugenol; Materiais Restauradores do Canal Radicular; Óxido de Zinco.

¹Clínica de Especialidades infantiles/ Bebê Clínica de la Universidad Estadual de Londrina. Brasil.

²Universidade Estadual de Londrina. Brasil.

In vitro evaluation of the antimicrobial activity of CTZ paste and its components on standard microorganisms

Abstract: CTZ paste (chloramphenicol, tetracycline, zinc oxide and eugenol) is used to treat deciduous molars with necrotic pulp. The antimicrobial activity (AA) of different concentrations of the components of the CTZ paste against different microorganisms was evaluated *in vitro*. Thus, the medications were divided into 6 groups: P1: 250 mg of tetracycline + 250 mg of chloramphenicol + 500 mg of zinc oxide (ZO) + 0.6 ml of eugenol (original proportion), P2: 500 mg of tetracycline + 500 mg of ZO + 0.6 ml eugenol, P3: 500 mg chloramphenicol + 500 mg ZO + 0.6 ml eugenol, P4: 1000 mg ZO + 0.6 ml eugenol, P5: 0.006 ml eugenol, P6: 1000 mg of ZO + saline solution (0.85%), and evaluated against individual standard microorganisms: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Agar diffusion tests (ADT) and direct exposure tests (DET) were applied. The data were subjected to ANOVA and Tukey test ($p < 5$) were applied. P1 had greater AA compared to the other groups. For the evaluation of *Escherichia coli*, no statistically significant difference was observed between groups P1 and P3. Direct exposure test demonstrated antimicrobial effectiveness for groups P1, P2, P3, P4 and P5 in the time intervals evaluated and ineffectiveness for P6 due to the absence of eugenol. Therefore, it can be concluded that group P1 presented the highest antimicrobial activity among groups in the ADT. DET demonstrated antimicrobial effectiveness in groups with eugenol in its composition, which suggests a bactericidal effect of this component.

Key words: Anti-Infective Agents, Dental Caries, Eugenol, Root Canal Filling Materials, Zinc Oxide.

Introducción

Las terapias pulpares en dientes deciduos representan procedimientos comúnmente realizados en odontopediatría que tienen como objetivo mantener la integridad, salud y funcionalidad de los dientes y tejidos de soporte hasta su exfoliación natural¹. Las terapias pulpares se pueden dividir en conservadoras e invasivas, siendo fundamental el diagnóstico para elegir el tipo de tratamiento a realizar^{2,3}.

En los casos de necrosis pulpar en molares deciduos, se imponen desafíos al operador debido a la complejidad anatómica y morfológica de estos dientes, caracterizados por la presencia de canales accesorios, curvaturas, gran diversidad microbiana y rizolisis irregular⁴⁻⁶. Estos factores dificultan la preparación químico mecánica eficaz y el establecimiento fiable de los límites apicales, y estas dificultades afectan la cooperación de los

niños pequeños^{4,6}. La elección y uso de una pasta de obturación antimicrobiana que tenga un amplio espectro de acción, buena difusión y que no cause daño a los tejidos periapicales y a los dientes permanentes, representa uno de los aspectos más importantes para el éxito de la terapia pulpar^{7,8}.

Aunque no existe consenso en la literatura sobre cuál es la pasta ideal para dientes primarios con necrosis pulpar, existen varios materiales de obturación antimicrobianos disponibles, como: pasta de hidróxido de calcio, óxido de zinc y eugenol¹, pastas iodoformadas¹ y pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina y óxido de zinc - proporción 1:1:2 - asociada a eugenol)^{10,11}. Esta pasta fue propuesta por Cappiello en 1964, en Argentina, para el tratamiento de dientes temporales con pulpa necrótica y puede usarse para técnicas de Esterilización de Lesiones y Reparación de Tejidos (LSTR) o obturación

de conductos radiculares^{10,12,13}. Las propiedades de este material endodóntico incluyen un amplio espectro de acción, alta actividad bacteriostática^{10,11,14} con efectos sobre la síntesis de proteínas bacterianas y la inhibición del crecimiento bacteriano^{10,11}, y resultados clínicos y radiográficos satisfactorios¹⁴. La pasta CTZ se puede encontrar comercialmente en laboratorios especializados en manipulación en forma de cápsulas, con la proporción solicitada. Desde el punto de vista clínico, el polvo debe dosificarse sobre una placa de vidrio esterilizada y mezclarse con una gota de eugenol utilizando una espátula metálica esterilizada, hasta que adquiera una consistencia similar a la de un dentífrico. Además, el procedimiento de inserción de la pasta es simple y no requiere instrumentación adicional ni pasos de obturación del conducto radicular^{10,11}, se puede realizar en una sola sesión^{10,14,15}, favorece la estabilización de la resorción ósea y no provoca sensibilidad tisular^{14,15}. Entre las ventajas de utilizar este material se encuentran la reducción del tiempo clínico, la colaboración del niño y la optimización del tiempo dedicado al cuidado del niño^{13,14}.

Considerando la escasa literatura sobre el uso de la pasta CTZ en dientes primarios con necrosis pulpar, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar in vitro la actividad antimicrobiana y la efectividad de los componentes de la pasta CTZ, utilizados individualmente o en diferentes combinaciones y concentraciones, contra seis microorganismos. previamente seleccionado para Prueba de Difusión y Prueba de Exposición Directa.

Metodología

Diseño del estudio - primera fase

Todas las cepas fueron aisladas, identificadas, cultivadas y mantenidas viables en el laboratorio de la Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Para realizar las pruebas de la primera y segunda etapa, la pasta CTZ y sus componentes se dividieron en seis grupos de medicamentos como se muestra en la tabla 1. La actividad antimicrobiana de cada grupo se evaluó individualmente frente a seis microorganismos estándar de

Tabla 1. Composición de los seis grupos de medicamentos evaluados.

Grupos	Antibióticos	Óxido de zinc	Solución salina (0.85%)	Eugenol
P1	250 mg de tetraciclina + 250 mg de cloranfenicol	500 mg	-----	0,6 ml
P2	500 mg de tetraciclina	500 mg	-----	0,6 ml
P3	500 mg de cloranfenicol	500 mg	-----	0,6 ml
P4	-----	1000 mg	-----	0,6 ml
P5	-----	-----	-----	0,006 ml
P6	-----	1000 mg	X	-----

diferentes especies de la *American Type Culture Collection* (ATCC), morfológicamente distintos, con predominio de bacterias anaeróbicas facultativas (Tabla 2). Se seleccionaron estos microorganismos porque se encuentran comúnmente en casos de necrosis pulpar en dientes deciduos^{7,16,17}.

Tabla 2. Microorganismos utilizados en el estudio.

Microorganismos estándar	Acrónimos	Características
<i>Streptococcus mutans</i> (INCQS 0054-CCT 3440) (ATCC 25175)	M1	Cocos anaerobios facultativos, grampositivos, no esporulados. Se encuentran predominantemente en la cavidad bucal y actúan como agente etiológico de la caries.
<i>Lactobacillus casei</i> (CT) INCQS 0006 (ATCC 7469)	M2	Bacilos anaeróbicos facultativos (a veces microaerófilos) grampositivos, no esporulados. Se encuentran en la cavidad bucal y desempeñan un papel importante en la etiología de la caries.
<i>Staphylococcus aureus</i> (INCQS 00039)	M3	Cocos grampositivos, no esporulados, anaerobios facultativos, presentes en infecciones como traumatismos, abscesos dentales, faringitis, amigdalitis, sinusitis y osteomielitis de la cara.
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 23212)	M4	Cocos anaerobios facultativos, grampositivos, no esporulados. Se encuentran en bajas concentraciones en la cavidad bucal y pueden estar asociados a procesos infecciosos, especialmente en los conductos radiculares dentales.
<i>Escherichia coli</i> (INCQS 00032)	M5	Bacilos Gram negativos, no esporulados; aerobios o anaerobios facultativos. Su hábitat natural es el tracto intestinal de humanos y animales.
<i>Bacillus subtilis</i> (CT) INCQS 000349 (ATCC 9372)	M6	Bacilos esporulantes aerobios, grampositivos. Están formados por microorganismos saprofitos que prevalecen en el suelo, el agua, el aire y la vegetación.

Los medios de cultivo líquidos y sólidos utilizados en el desarrollo de la investigación se describen en la tabla 3. El proceso de preparación y esterilización al que fueron sometidos (121°C/15 min) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los microorganismos estándar, que fueron liofilizados o en agar stock, se recuperaron inicialmente en 3 ml de caldo BHI o medio específico y se incubaron a 37°C/24h. La suspensión obtenida se ajustó al tubo #1 de la Escala MacFarland, hasta obtener una concentración microbiana final de aproximadamente 3 X 10⁸ bacterias/ml, considerada ideal para el desarrollo de la investigación. De esta muestra se sembró un volumen de 0,1 ml de esta suspensión (inóculo) en seis tubos con 3 ml de caldo BHI o medio específico, para cada microorganismo estándar evaluado.

Tabla 3. Listado de medios de cultivo seleccionados para el cultivo de diferentes tipos de microorganismos estándar.

Medios de cultivo	Microorganismos estándar
Caldo BHI (Brain Heart Infusion- Acumedia®)	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>
BHI Agar (Brain Heart Infusion- Acumedia®)	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>
Caldo <i>Mitis salivarius</i> *	<i>Streptococcus mutans</i>
Ágar <i>Mitis salivarius</i> (Acumedia®)	<i>Streptococcus mutans</i>
Caldo jugo de tomate*	<i>Lactobacillus casei</i>
Agar jugo de tomate (Acumedia®)	<i>Lactobacillus casei</i>

** O caldo *mitis salivarius* e o caldo jugo de tomate fueron manipulados.

La técnica de siembra elegida para realizar la prueba de difusión en agar fue el "pour plate". En esta investigación, los microorganismos estándar fueron evaluados individualmente en todos los experimentos realizados. Se inoculó en 18 tubos un volumen de 0,1 ml de la suspensión microbiana, que contenía 20 ml de agar BHI o medio específico, disueltos a una temperatura de 40-45°C, en 18 tubos por cada microorganismo estándar. A continuación, los medios se vertieron en cajas de Petri y se sometieron a suaves movimientos de rotación para mezclar la suspensión microbiana (inóculo) en el agar, con el fin de obtener un crecimiento confluyente de colonias en el medio de cultivo. Para evaluar M5 fue necesario ajustar el volumen de inóculo de 0,1 ml a 5 ml en 20 ml de agar *mitis salivarius*.

Después de sembrar las placas, se crearon cinco cavidades en el agar, de 4 mm de diámetro y 4 mm de profundidad (espesor correspondiente a la capa de medio de cultivo en cuestión), con la ayuda de un perforador metálico esterilizado, con el objetivo de depositar los grupos de pastas en un estandarizado.

Las pastas se obtuvieron mediante homogeneización de los componentes en polvo (Laboratorio OdontoFarma, Londrina, Paraná, Brasil), sobre placa de vidrio con espátula metálica 24F (SSWhite Duflex, Juiz de Fora, MG, Brasil), ambas esterilizadas, seguida de incorporación a eugenol. (Biomedicina Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil). Estos fueron espatulados durante 1 minuto, hasta que adquirieron la consistencia de pasta de dientes.

Los grupos P1, P2, P3, P4 y P5 se depositaron en las cavidades previamente preparadas, con ayuda de palos de madera

estériles, hasta su llenado. Para evaluar el eugenol, correspondiente al grupo P6, se realizó en discos de papel de filtro, de 6 mm de diámetro, depositados bajo el agar con ayuda de pinzas de algodón clínicas 317 (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). En este experimento, se realizó un control negativo para cada microorganismo estándar.

Después de insertar las pastas en las cavidades, estas se preincubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida de incubación en estufa bacteriológica a 37° C durante un período de 24 a 48 horas, según el microorganismo patrón evaluado. Los experimentos se realizaron asépticamente y por triplicado. Se evaluaron un total de 108 placas de Petri.

Evaluación de muestras y análisis estadístico.

Después de este período, los resultados fueron leídos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano, formados alrededor de cada cavidad, con la ayuda de una regla milimétrica (Tilibra®, Bauru, São Paulo, Brasil) y una buena fuente de luz reflejada. Sólo se anotaron los diámetros correspondientes a los bordes más afilados de los halos.

Los datos obtenidos en la evaluación de cada microorganismo estándar fueron sometidos a análisis estadístico mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% (IBM SPSS Statistics for Windows Software, versión 25 (IBM, Armonk, NY, USA).

Segunda etapa

En la segunda etapa se llevó a cabo la efectividad de la acción antimicrobiana de estos grupos mediante la prueba de

exposición directa. Esta prueba consistió en sumergir conos de papel contaminados con microorganismos estándar en cajas de Petri que contenían los medicamentos evaluados, donde permanecieron en contacto directo con ellos durante 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1h y 24h. Después de este intervalo, los conos se insertaron individualmente en tubos de 5 ml de BHI o medio específico y se incubaron a 37°C/120h. Los resultados se interpretaron observando la turbidez en el medio de cultivo.

Resultados

De los resultados de los diámetros de los halos, en milímetros, surgidos en el período de 24 y 48 horas, se desprende que el grupo P1 (correspondiente a la pasta completa), presentó los mayores valores (en mm) de la diámetros promedio de los halos de inhibición, en comparación con los cinco microorganismos estándar evaluados en el experimento. En orden descendente, los grupos P3, P2, P4, P5 y P6 presentaron los mayores halos de inhibición (Figura 1).

Considerando que el objetivo de este estudio no fue realizar una comparación entre los microorganismos evaluados, sino sólo entre los grupos de medicamentos, se encontró que los resultados reseñados en este gráfico diferían poco entre los microorganismos. El grupo P1 presentó, en todos los experimentos, mayor actividad antimicrobiana en relación a los demás grupos, con excepción de la evaluación de *Escherichia coli*, en la que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos P1 y P3. La misma observación se realizó para las medias de los grupos P4 y P5, que no mostraron diferencia significativa (5%), en todos los microorganismos estándar evaluados.

Las tablas 4 y 5 describen los resultados obtenidos al evaluar la efectividad de la acción antimicrobiana de los 6 grupos de medicamentos contra microorganismos estándar, mediante exposición directa, en períodos de 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1h, 24h. Los grupos de control en este experimento no se expresaron en las tablas. El control negativo, representado por tubos de ensayo que contenían únicamente caldo

Figura 1. Gráfico de los diámetros promedio de las zonas de inhibición que presentan los cinco microorganismos estándar evaluados.

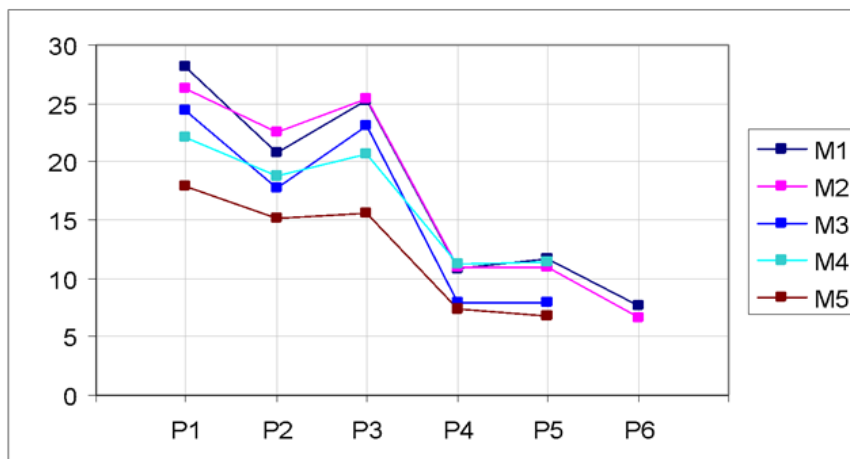


Tabla 4. Representación de los resultados obtenidos en la prueba de exposición directa para los grupos de medicamentos: P1, P2, P3, P4 y P5, en diferentes intervalos de tiempo.

Microorganismos estándar	Intervalos de tiempo					
	5 min	10 min	15 min	30 min	1 h	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	---	---	---	---	---	---
<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	---	---	---	---
<i>Escherichia coli</i>	---	---	---	---	---	---
<i>Bacillus subtilis</i>	---	---	---	---	---	---
<i>Streptococcus mutans</i>	---	---	---	---	---	---
<i>Lactobacillus casei</i>	---	---	---	---	---	---
Actividad de la pasta	EB	EB	EB	EB	EB	EB

(-) Resultado negativo = Ausencia de turbidez = Ausencia de crecimiento microbiano = Efectividad del medicamento.

(+) Resultado positivo = Presencia de turbidez = Presencia de crecimiento microbiano = Ineficacia del medicamento.

(EB) = Efecto bactericida.

(---) = Los signos representan la evaluación por triplicado de las puntas del papel.

Tabla 5. Prueba de exposición directa aplicada a P6 (Óxido de Zinc y Solución Salina) en diferentes intervalos de tiempo.

Microorganismos estándar	Intervalos de tiempo					
	5 min	10 min	15 min	30 min	1 h	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Streptococcus mutans</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus casei</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Actividad de la pasta	IN	IN	IN	IN	IN	IN

(-) Resultado negativo = Ausencia de turbidez = Ausencia de crecimiento microbiano = Efectividad del medicamento.

(+) Resultado positivo = Presencia de turbidez = Presencia de crecimiento microbiano = Ineficacia del medicamento.

(IN) = Ineficacia del medicamento en el intervalo de tiempo evaluado.

(+++)= Los signos representan la evaluación por triplicado de las puntas del papel.

estéril, no mostró turbidez en el medio de cultivo. El control positivo indicó la presencia de turbidez en la lectura de 24 horas para todos los microorganismos estándar evaluados. El análisis de este resultado fue macroscópico y microscópico, mediante el Método de Tinción de Gram (MTG). Los resultados presentados en las tablas corresponden a la lectura de 120h del experimento.

Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los componentes aislados y combinados de la pasta CTZ frente a diferentes microorganismos estándar y cuáles tuvieron los mayores impactos. La alta prevalencia de caries y traumatismos dentales no tratados en los dientes primarios a menudo puede progresar hasta provocar daños irreversibles en la pulpa, lo que lleva a abscesos y fístulas. En los casos de necrosis pulpar, la infección polimicrobiana del conducto radicular suele mostrar un predominio de estreptococos y microorganismos anaeróbicos^{18,19}. Este hecho respalda el uso de los microorganismos seleccionados en el presente estudio, en base a sus características reseñadas en la tabla 2. En este contexto, seleccionar una pasta como CTZ, que contiene dos antibióticos, es un factor clave para lograr el éxito en el tratamiento propuesto. Además, es esencial que el médico comprenda sus características, limitaciones, efecto antimicrobiano, así como la conveniencia clínica que brinda la pasta CTZ.

Se sabe que los halos de inhibición del crecimiento microbiano expresan

la capacidad de difusión del fármaco evaluado en medio de cultivo sólido y el tamaño depende de la solubilidad y difusividad del fármaco evaluado. Por este motivo, es posible que los halos no expresan eficazmente todo el potencial del agente antimicrobiano^{20,21}. La velocidad de difusión en el agar y el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento dependen de factores como: concentración de agar, temperatura, pH, características nutricionales, concentraciones de iones en el medio de cultivo, espesor de la capa de agar y concentración del inóculo^{20,21}. Para minimizar la posible interferencia con los resultados, los procedimientos fueron realizados por dos operadores, de forma aséptica y por triplicado.

Una consideración de este estudio se refiere a la evaluación de la actividad antimicrobiana de la pasta CTZ y sus componentes sobre *Lactobacillus casei* mediante la prueba de difusión en agar. Una de las dificultades encontradas en estos experimentos fue la aplicación de la técnica de siembra en plato vertido en esta evaluación. Se observó crecimiento confluyente de colonias bacterianas en el agar sobre 6 placas sembradas con un volumen de 1 ml de inóculo en 20 ml de agar jugo de tomate, después de 48 horas de incubación en estufa bacteriológica a 37°C. Sin embargo, en estos resultados no se observó la formación de halos de inhibición o halos de difusión alrededor de las cavidades llenas con el fármaco de prueba. En este estudio no se aclaró la razón por la que esto impidió la libre difusión del fármaco bajo el agar. La confirmación de la presencia de crecimiento microbiano se realizó mediante observación microscópica del medio de cultivo, utilizando como parámetro MTG.

Por lo que se decidió sembrar por esparcimiento. Mediante esta técnica se distribuyó un volumen de 0,1 ml de inóculo por toda la superficie del agar tomate, con ayuda de un asa de Drigalski. Luego del período de incubación correspondiente a 48 horas, se observó la formación de halos alrededor de los fármacos evaluados. Estos halos no eran completamente traslúcidos, como se observa a menudo en zonas de inhibición del crecimiento microbiano. Si bien el caldo de jugo de tomate fue manipulado cuidadosamente por los operadores para preparar la suspensión microbiana, también se observó la existencia de residuos de pulpa de tomate que, depositados sobre el agar, dificultaron la interpretación de los resultados en la región interna de los halos formados.

Por lo tanto, fue entonces necesario verificar la presencia de colonias bacterianas en esa región, recolectando una porción de ese residuo ubicado cerca del medicamento evaluado, con la ayuda de un asa de platino en un movimiento de arrastre. Este material fue teñido con MTG y analizado microscópicamente. La investigación se realizó en tres placas, para los 6 grupos de medicamentos. Como todo el experimento se realizó por triplicado, se evaluaron un total de 18 portaobjetos, confirmando la presencia de colonias del microorganismo probado dentro de los halos.

A partir de estas observaciones, se evaluaron seis discos de papel que contenían los antimicrobianos tetraciclina (30 mcg) y cloranfenicol (30 mcg), con el objetivo de conocer la susceptibilidad de estos antimicrobianos (disociados de la pasta) sobre *Lactobacillus casei*,

mediante el método de difusión en disco. El experimento se realizó en tres cajas de Petri, sembradas por extensión sobre agar tomate, con un volumen de 0,1 ml de inóculo. Los discos que contenían los antibióticos a probar (3 por cada antimicrobiano) se depositaron sobre el agar y se incubaron durante 48 h a 37°C, luego de la lectura y medición de las zonas de inhibición con una regla milimétrica, la cual se comparó con las mediciones proporcionadas por los productores discográficos.

Mediante esta prueba se observó que *Lactobacillus casei* era resistente al cloranfenicol e intermedicamente sensible a la tetraciclina. La presencia de colonias dentro del halo formado alrededor de las cavidades llenas del medicamento puede estar relacionada con la resistencia que presenta este microorganismo a los antimicrobianos evaluados. Además, la tetraciclina y el cloranfenicol, al combinarse, le otorgaron a la pasta una mayor actividad antimicrobiana en relación a sus componentes evaluados por separado, como propone Cappiello (1964)¹⁰. La presencia de sinergismo en esta interacción entre dos antibióticos bacteriostáticos se observó para todos los microorganismos evaluados, con excepción de la evaluación de *Escherichia coli*, en la que no hubo diferencia significativa entre las medias de los grupos P1 y P3. Los datos recogidos en la evaluación de *Lactobacillus casei* no fueron sometidos a análisis estadístico, ya que no hubo formación de halos de inhibición.

El grupo P6 (óxido de zinc y solución salina) no mostró actividad antimicrobiana en la evaluación de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus mutans*. En este

caso sólo se observó la formación de un halo de difusión del propio medicamento. Para obtener una confirmación más fiable de si habría o no crecimiento microbiano, se recogió una porción del agar de la zona interna de este halo. el cual luego se introdujo en un medio de cultivo líquido (caldo BHI o medio específico) y se llevó a incubación en estufa bacteriológica a 37°C/48h. Después de MTG, el material se analizó mediante microscopía óptica para visualizar colonias bacterianas.

Para todos los microorganismos evaluados, el grupo P3 mostró mayor actividad antimicrobiana en comparación con el grupo P2. Sólo en la evaluación de *Streptococcus mutans* no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las medias de estos grupos. Teniendo en cuenta estos resultados, cabe destacar que la ausencia de cualquier componente en la pasta puede influir en la actividad antimicrobiana, como se evidencia en este estudio. El cloranfenicol, por ejemplo, tiene un amplio espectro contra bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y su mecanismo de acción se da inhibiendo el proceso de síntesis de proteínas bacterianas^{22,23}. La tetraciclina, a su vez, es un agente bacteriostático de amplio espectro que también inhibe la síntesis de proteínas bacterianas. Por otro lado, la tetraciclina tiene desventajas relacionadas con el potencial de pigmentación de la corona y el desarrollo de hipoplasia del esmalte en el premolar sucesor debido a su alta afinidad por los tejidos calcificados^{15,24}. Además, el color amarillento inherente y el consiguiente oscurecimiento de los dientes, hecho que puede resultar desventajoso y desalentar su uso en zonas estéticas, como los incisivos superiores. Para paliar estas desventajas, eliminar, sustituir o

reducir la proporción de tetraciclina puede ser una alternativa interesante y viable. Para ello, son necesarios estudios clínicos e *in vitro* adicionales para evaluar las propiedades antimicrobianas y la eficacia del tratamiento endodóntico utilizando una pasta modificada.

Los resultados obtenidos mostraron que los grupos P1, P2, P3, P4 y P5 fueron efectivos contra los seis microorganismos estándar, en todos los intervalos de tiempo evaluados. En relación a las pastas control sin antibióticos (P4, P5 y P6), el grupo P6 fue el único que demostró ineficacia contra los microorganismos probados, ya que el medio de cultivo mostró turbidez a los 5 minutos, lo que nos llevó a considerar que este resultado podría ser relacionado con la ausencia de eugenol en su composición.

Otro resultado derivado de este estudio refiere a que los grupos P4 y P5 presentaron medias con valores muy cercanos, estadísticamente no significativos, aún con la discrepancia observada en el volumen de eugenol entre estos grupos (0,6 ml en P4 y 0,0006 ml en P5). Por lo tanto, la eficacia antimicrobiana observada en el grupo P4 se atribuyó a la presencia de eugenol en su composición, ya que el óxido de zinc evaluado por separado (P6) no fue efectivo contra los microorganismos estándar probados. El eugenol tiene acción bactericida, debido a su alta afinidad por la membrana plasmática (liposolubilidad) y su capacidad para inhibir la respiración bacteriana y la división celular^{25,26}.

En definitiva, aunque este estudio *in vitro* presentó resultados interesantes, cabe mencionar algunas limitaciones metodológicas. Entre ellas, una limitación considerable se refiere a que las bacterias

no se encuentran aisladas, sino en consorcios. Por lo tanto, los hallazgos deben interpretarse con precaución, ya que no sabemos si los resultados de la exposición *in vitro* a cepas individuales serán los mismos que la reacción del sistema de canales necróticos. Además, la respuesta de cada organismo puede variar e influir en el pronóstico dental. En general, se deben realizar más estudios clínicos basados en nuestros hallazgos para confirmar las implicaciones clínicas.

Conclusión

Con base en los resultados del presente estudio, se puede concluir que la combinación de todos los componentes de la pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina

y óxido de zinc - proporción 1:1:2, respectivamente) y eugenol como vehículo de manipulación, presentó actividad antimicrobiana contra microorganismos *in vitro*. Sin embargo, cuando los componentes de la pasta CTZ se evaluaron por separado, mostraron diámetros promedio de halos de inhibición más pequeños en comparación con la combinación de todos los fármacos. Además, el uso individual de eugenol mostró eficacia antimicrobiana, mientras que la ausencia de este producto probado por sí solo no mostró eficacia contra los microorganismos.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Referencias bibliográficas

1. American Academy of Pediatric Dentistry. Pulp therapy for primary and immature permanent teeth. The Reference Manual of Pediatric Dentistry. Chicago, Ill.: American Academy of Pediatric Dentistry; 2023:457-65.
2. Smail-Faugeron V, Glenn AM, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Fron Chabouis H. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 May 31;5(5):CD003220. doi: 10.1002/14651858.CD003220.pub3. PMID: 29852056; PMCID: PMC6494507.
3. Waterhouse P. Are different pulp treatment techniques and associated medicaments effective for the treatment of extensive decay in primary teeth? *Evid Based Dent.* 2021 Jan;22(1):12-13. doi: 10.1038/s41432-021-0162-6. PMID: 33772121.
4. Ahmed HM. Anatomical challenges, electronic working length determination and current developments in root canal preparation of primary molar teeth. *Int Endod J.* 2013 Nov;46(11):1011-22. doi: 10.1111/iej.12134. Epub 2013 May 25. PMID: 23711096.
5. Moura LFAD, Lima MDM, Lima CCB, Bandeira AVL, Moura MS, Conde Júnior AM, Rizzo MDS. Cellular profile of primary molars with pulp necrosis after treatment with antibiotic paste. *Int J Exp Pathol.* 2018 Oct;99(5):264-268. doi: 10.1111/iep.12292. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30324690; PMCID: PMC6302786.
6. Mohd Ariffin S, Dalzell O, Hardiman R, Manton DJ, Parashos P, Rajan S. Root canal morphology of primary maxillary second molars: a micro-computed tomography analysis. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2020 Aug;21(4):519-525. doi: 10.1007/s40368-020-00515-z. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32100200.
7. Piva F, Faraco-Junior IM, Estrela C. Antimicrobial activity of different root canal filling pastes used in deciduous teeth. *Material Res.* 2008; 11: 171-173.
8. Achanta A, Reche A, Dakhale R, Bharate RR. A Comprehensive Review of Lesion Sterilization and Tissue Repair: An Alternative for Pulpectomy in Deciduous Teeth. *Cureus.* 2023 Nov 3;15(11):e48218. doi: 10.7759/cureus.48218. PMID: 38054133; PMCID: PMC10694391.
9. Oliveira SCMD, Omena ALCSD, Lira GADL, Ferreira IA, Imperato JCP, Calvo AFB.. Do different proportions of antibiotics in the CTZ paste interfere with the antimicrobial action? *In vitro* study. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada.* 2020, 19, e4801.
10. Cappiello J. Tratamientos pulpares em incisivos primários. *Rev Assoc Odontol Argentina.* 1964; 52:139-45.

11. de Deus Moura L de F, de Lima M de D, Lima CC, Machado JI, de Moura MS, de Carvalho PV. Endodontic Treatment of Primary Molars with Antibiotic Paste: A Report of 38 Cases. *J Clin Pediatr Dent.* 2016;40(3):175-7. doi: 10.17796/1053-4628-40.3.175. PMID: 27472562.
12. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J.* 2004 Feb;37(2):132-8. doi: 10.1111/j.0143-2885.2004.00771.x. PMID: 14871180.
13. Castro M, Lima M, Lima C, Moura M, Moura J, Moura L. Lesion sterilization and tissue repair with chloramphenicol, tetracycline, zinc oxide/eugenol paste versus conventional pulpectomy: A 36-month randomized controlled trial. *Int J Paediatr Dent.* 2023 Jul;33(4):335-345. doi: 10.1111/ipd.13056. Epub 2023 Feb 12. PMID: 36719000.
14. Luengo-Ferreira J, Ayala-Jiménez S, Carlos-Medrano LE, Toscano-García I, Anaya-Álvarez M. Clinical and Radiographic Evaluation of Formocresol and Chloramphenicol, Tetracycline and Zinc Oxide-Eugenol Antibiotic Paste in Primary Teeth Pulpotomies: 24 month follow up. *J Clin Pediatr Dent.* 2019;43(1):16-21. doi: 10.17796/1053-4625-43.1.4. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30289365.
15. Sousa PM, Duarte RC, Sousa SA. Clinical and radiographic monitoring of primary teeth submitted to pulp therapy with CTZ paste. *Braz Res Pediatr Dent Integr Clin.* 2014;14(Suppl.3):56-68. <https://dx.doi.org/10.4034/PBOCI.2014.14s3.06>.
16. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias Lde M. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Apr;16(2):100-5. doi: 10.1034/j.1399-302x.2001.016002100.x. PMID: 11240863.
17. Amorim LF, Toledo OA, Estrela CR, Decurcio Dde A, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J.* 2006;17(4):317-22. doi: 10.1590/s0103-64402006000400010. PMID: 17262146.
18. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Oct-Dec;17(4):367-71. doi: 10.1590/s1517-74912003000400013. Epub 2004 Apr 19. PMID: 15107921.
19. Silva LA, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MC, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J.* 2006;17(2):144-8. doi: 10.1590/s0103-64402006000200012. PMID: 16924343.
20. Estrela C, Estrela CRA, Moura J, Bammann LL. Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. *J Dent Res.* 2000;79, p.529, 2000.
21. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Oct;20(10):981-90. doi: 10.1111/1469-0691.12651. Epub 2014 Jun 14. PMID: 24766583.
22. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima ME, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista brasileira de Farmacognosia.* 2008;18, 301-307.
23. Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, Qin X, Tarr PI, Dantas G. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS One.* 2013 Nov 13;8(11):e78822. doi: 10.1371/journal.pone.0078822. PMID: 24236055; PMCID: PMC3827270.
24. Sousa HCS, Lima MDM, Lima CCB, Moura MS, Bandeira AVL, Deus Moura LFA. Prevalence of Enamel Defects in Premolars Whose Predecessors Were Treated with Extractions or Antibiotic Paste. *Oral Health Prev Dent.* 2020 Sep 4;18(4):793-798. doi: 10.3290/j.ohpd.a45083. PMID: 32895663.
25. Oliveira LM, Siqueira FS, Silva MT, Machado JVC, Cordeiro CF, Diniz LF, Campos MMA, Franco LL, Souza TB, Hawkes JA, Carvalho DT. Synthesis and antimicrobial activity of molecular hybrids based on eugenol and chloramphenicol pharmacophores. *Folia Microbiol (Praha).* 2023 Dec;68(6):823-833. doi: 10.1007/s12223-023-01057-9. Epub 2023 Apr 29. PMID: 37118368.
26. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, Izadi M, Abdollahi M, Nabavi SM, Ajami M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Crit Rev Microbiol.* 2017 Nov;43(6):668-689. doi: 10.1080/1040841X.2017.1295225. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28346030.

Recibido 15/05/24

Aceptado 27/11/24

Correspondencia: Lucas Fernando Oliveira Tomás Ferraresso, correo: lucas.ferraresso@unesp.br