

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

Farli Aparecida Carrilho Boer¹ , Lucas Fernando Oliveira Tomáz Ferraresso¹ ,
Karina Tomoe Ajimura¹ , Regina Lúcia dos Santos² , Wanda Terezinha Garbelini Frossard³ .

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 microrganismos. 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.

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

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 microrganismos. 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.

¹Clinica 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.

Introdução

As terapias pulpares em dentes decíduos representam procedimentos comumente realizados em odontopediatria que visam manter a integridade, saúde e funcionalidade dos dentes e tecidos de suporte até sua esfoliação natural¹. As terapias pulpares podem ser divididas em conservadoras e invasivas, sendo o diagnóstico essencial para a escolha do tipo de tratamento a ser realizado^{2,3}.

Nos casos de necrose pulpar em molares decíduos, desafios são impostos ao operador devido à complexidade anatômica e morfológica desses dentes, caracterizada pela presença de canais acessórios, curvaturas, grande diversidade microbiana e rizólise irregular⁴⁻⁶. Esses fatores dificultam a preparação químico-mecânica eficaz e o estabelecimento confiável dos limites apicais, e essas dificuldades afetam a cooperação de crianças pequenas^{4,6}.

A escolha e utilização de uma pasta antimicrobiana para obturação que tenha amplo espectro de ação, boa difusão e que não cause danos aos tecidos periapicais e aos dentes permanentes, representa um dos aspectos mais importantes para o sucesso da terapia pulpar^{7,8}.

Embora não haja consenso na literatura quanto à pasta ideal para dentes decíduos com necrose pulpar, existem vários materiais obturadores antimicrobianos disponíveis, como: pasta de hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol¹, pastas iodoformadas¹ e pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina e óxido de zinco - proporção 1:1:2 - associados ao eugenol)^{10,11}. Esta pasta foi proposta por Cappiello em 1964, na Argentina, para o tratamento de dentes decíduos com polpa necrótica e pode ser utilizada para as técnicas de Esterilização de Lesões e Reparo Tecidual (LSTR) ou obturação de canais radiculares^{10,12,13}. As propriedades deste material endodôntico incluem um

amplo espectro de ação, alta atividade bacteriostática^{10,11,14} com efeitos na síntese de proteínas bacterianas e inibição do crescimento bacteriano^{10,11}, e resultados clínicos e radiográficos satisfatórios¹⁴. A pasta CTZ pode ser encontrada comercialmente em laboratórios especializados em manipulação na forma de cápsulas, com a proporção solicitada. Do ponto de vista clínico, o pó deve ser dispensado em uma placa de vidro estéril e misturado com uma gota de eugenol usando uma espátula metálica estéril, até adquirir uma consistência semelhante à de um dentifrício. Além disso, o procedimento de inserção da pasta é simples, não requer instrumentação ou etapas adicionais de obturação do canal radicular^{10,11}, pode ser realizado em uma sessão^{10,14,15}, promove a estabilização da reabsorção óssea e não causa sensibilidade tecidual^{14,15}. Entre as vantagens da utilização deste material estão a redução do tempo clínico, a colaboração da criança e a otimização do tempo gasto no cuidado à criança^{13,14}.

Considerando a escassa literatura sobre o uso da pasta de CTZ em dentes decíduos

com necrose pulpar, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e a eficácia dos componentes da pasta de CTZ, utilizados individualmente ou em diferentes combinações e concentrações, contra seis microrganismos previamente selecionados para Teste de Difusão e Teste de Exposição Direta.

Metodologia

Desenho do estudo - primeira fase

Todas as cepas foram isoladas, identificadas, cultivadas e mantidas viáveis no laboratório da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Para a realização dos testes na primeira e segunda etapas, a pasta CTZ e seus componentes foram divididos em seis grupos de medicamentos conforme o quadro 1. A atividade antimicrobiana de cada grupo foi avaliada individualmente contra seis microrganismos padrões de diferentes espécies da *American Type Culture Collection* (ATCC), morfologicamente distintos, com predominância de bactérias

Quadro 1. Composição dos seis grupos de medicamentos avaliados.

Grupos	Antibióticos	Óxido de zinco	Solução 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	-----

anaeróbias facultativas (Quadro 2). Esses microrganismos foram selecionados por serem comumente encontrados em casos de necrose pulpar em dentes decíduos^{7,16,17}.

Os meios de cultura líquidos e sólidos utilizados no desenvolvimento da pesquisa estão descritos no quadro 3. O processo

Quadro 2. Microrganismos utilizados no estudo.

Microrganismos padrões	Siglas	Características
<i>Streptococcus mutans</i> (INCQS 0054-CCT 3440) (ATCC 25175)	M1	Cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos. São encontrados predominantemente na cavidade bucal e atuam como agente etiológico da cárie dentária.
<i>Lactobacillus casei</i> (CT) INCQS 0006 (ATCC 7469)	M2	Bastonetes Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos (às vezes microaerófilos). São encontrados na cavidade bucal e desempenham importante participação na etiologia da cárie dentária.
<i>Staphylococcus aureus</i> (INCQS 00039)	M3	Cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos, presente em infecções como traumatismos, abscessos dentários, quadros de faringite, amigdalite, sinusite e osteomielite da face.
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 23212)	M4	Cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos. São encontrados em baixa concentração na cavidade bucal e podem estar associados a processos infecciosos, principalmente nos canais radiculares dentários.
<i>Escherichia coli</i> (INCQS 00032)	M5	Bastonetes Gram-negativos, não esporulados; aeróbios ou anaeróbios facultativos. Seu habitat natural é o trato intestinal de seres humanos e animais.
<i>Bacillus subtilis</i> (CT) INCQS 000349 (ATCC 9372)	M6	Bacilos Gram-positivos, esporulados aeróbios. Consistem em microrganismos saprófitas que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação.

de preparo e esterilização a que foram submetidos (121°C/15 min), foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Os microrganismos padrões, que se encontravam liofilizados ou em ágar estoque foram inicialmente recuperados em 3 ml de caldo BHI ou meio específico e incubados à 37°C/ 24h. A suspensão obtida foi ajustada ao tubo #1 da Escala de MacFarland, até obter concentração microbiana final aproximada de 3 X 10⁸ bactérias/ml, considerada ideal para o desenvolvimento da pesquisa. A partir desta amostra, foi semeado o volume de 0,1 ml desta suspensão (inóculo), em seis tubos com 3 ml de caldo BHI ou meio específico, para cada microrganismo padrão avaliado.

Quadro 3. Relação dos meios de cultura selecionados para o cultivo dos diferentes tipos de microrganismos padrões.

Meios de cultura	Microrganismos padrões
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 suco de tomate foram manipulados.

A técnica de semeadura escolhida para a realização do teste de difusão em ágar foi o “pour plate”. Nesta pesquisa, os microrganismos padrões foram avaliados individualmente, em todos os experimentos realizados. Foram inoculados em 18 tubos para cada microrganismo padrão, o volume de 0,1 ml da suspensão microbiana, contendo 20 ml de ágar BHI ou meio específico, dissolvidos a temperatura de 40-45°C. Na sequência, os meios foram vertidos em Placas de Petri, e submetidos a movimentos rotatórios suaves, para misturar a suspensão microbiana (inóculo) no ágar, a fim de se obter crescimento confluyente de colônias no meio de cultura. Para a avaliação de M5 foi necessário ajuste no volume do inóculo de 0,1 ml para 5 ml em 20 ml de ágar *mitis salivarius*.

Após a semeadura das placas foram confeccionadas no ágar cinco cavidades, com 4 mm de diâmetro e 4mm de profundidade (espessura correspondente à camada do meio de cultura em questão), com o auxílio de perfurador metálico esterilizado, visando a deposição dos grupos de pastas de forma padronizada.

As pastas foram obtidas por meio da homogeneização dos componentes do pó (Laboratório OdontoFarma, Londrina, Paraná, Brasil), em uma placa de vidro com espátula metálica 24F (SSWhite Duflex, Juiz de Fora, MG, Brasil), ambas esterilizadas, seguida da incorporação ao eugenol (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiaporã, PR, Brasil). Estes foram espatulados durante 1min, até adquirir consistência de dentífrico.

Os grupos P1, P2, P3, P4 e P5 foram depositados nas cavidades previamente preparadas, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, até o limite de seu

preenchimento. Para avaliação do eugenol, correspondente ao grupo P6, foi realizada em discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, depositados sob o ágar com o auxílio de pinça clínica para algodão 317 (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). Neste experimento, foi realizado controle negativo para cada microrganismo padrão.

Após a inserção das pastas nas cavidades, as placas foram pré-incubadas por 01 hora a temperatura ambiente, seguida de incubação em estufa bacteriológica a 37° C, por um período de 24 a 48 horas, de acordo com o microrganismo padrão avaliado. Os experimentos foram conduzidos de forma asséptica e em triplicata. Ao total, foram avaliadas 108 placas de Petri.

Avaliação das amostras e análise estatística

Decorrido este período, a leitura dos resultados foi realizada pela mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento microbiano, formados ao redor de cada cavidade, com o auxílio de régua milimetrada (Tilibra®, Bauru, São Paulo, Brasil) e boa fonte de luz refletida. Foram anotados somente os diâmetros correspondentes às bordas mais nítidas dos halos.

Os dados obtidos na avaliação de cada microrganismo padrão foram submetidos a análise estatística por meio da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5% (IBM SPSS Statistics for Windows Software, version 25 (IBM, Armonk, NY, USA)).

Segunda etapa

Na segunda etapa, a efetividade da ação antimicrobiana desses grupos foi realizada pelo teste de exposição direta. Esse teste

consistiu na imersão de cones de papel contaminados com os microrganismos padrões em Placas de Petri contendo os medicamentos avaliados, onde permaneceram em contato direto com os mesmos durante 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h e 24 h. Decorrido esse intervalo, os cones foram inseridos individualmente em tubos de 5ml de BHI ou meios específicos e incubados a 37°C/ 120h. A interpretação dos resultados foi realizada pela observação da turvação no meio de cultura.

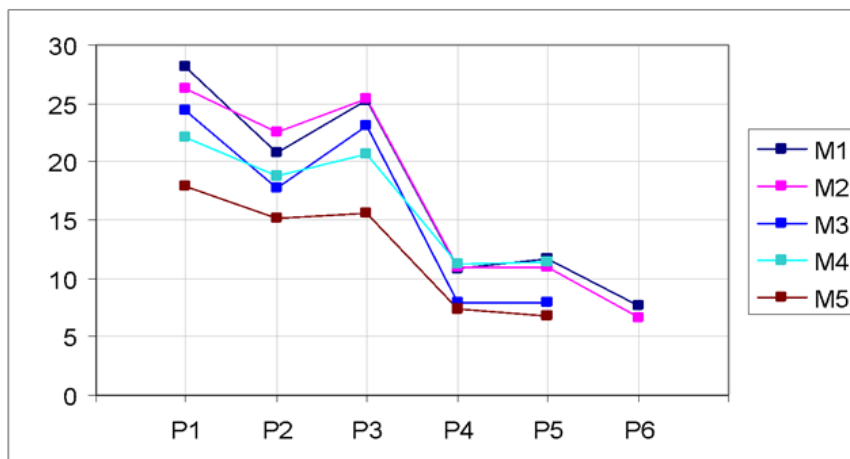
Resultados

A partir dos resultados dos diâmetros dos halos, em milímetros, decorrentes do período de 24 e 48 horas, pode-se observar que o grupo P1 (correspondente à pasta completa), apresentou os maiores valores (em mm) das médias dos diâmetros dos halos de inibição, comparativamente aos cinco microrganismos padrões avaliados no experimento. Em ordem decrescente, os grupos P3, P2, P4, P5 e P6 apresentaram os maiores halos de inibição (Figura 1).

Considerando que a proposta deste estudo não foi de realizar uma comparação entre os microrganismos avaliados, e sim, apenas entre os grupos de medicamentos, foi verificado que os resultados esquematizados neste gráfico pouco se diferenciaram entre os microrganismos. O grupo P1 apresentou, em todos os experimentos, maior atividade antimicrobiana em relação aos demais grupos, com exceção à avaliação da *Escherichia coli*, em que não houve, estatisticamente, diferença significativa entre as médias dos grupos P1 e P3. A mesma observação foi feita para as médias dos grupos P4 e P5, que não apresentaram diferença significativa (5%), em todos os microrganismos padrões avaliados.

Os quadros 4 e 5 descrevem os resultados obtidos na avaliação da efetividade da ação antimicrobiana dos 6 grupos de medicamentos contra os microrganismos padrões, por exposição direta, nos períodos de 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 24 h. Os grupos controle deste experimento não foram expressos nos quadros. O controle negativo, representado pelos tubos de ensaio contendo apenas o caldo estéril,

Figura 1. Gráfico das médias dos diâmetros dos halos de inibição apresentados pelos cinco microrganismos padrões avaliados.



Quadro 4. Representação dos resultados obtidos no teste de exposição direta para os grupos de medicamentos: P1, P2, P3, P4 e P5, em diferentes intervalos de tempo.

Microrganismos padrões	Intervalos de tempo					
	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>	---	---	---	---	---	---
Atividade da pasta	EB	EB	EB	EB	EB	EB

(-) Resultado negativo = Ausência de turvação = Ausência de crescimento microbiano = Efetividade do medicamento.
 (+) Resultado positivo = Presença de turvação = Presença de crescimento microbiano = Inefetividade do medicamento.
 (EB) = Efeito bactericida.
 (---) = Os sinais representam a avaliação em triplicata das pontas de papel.

Quadro 5. Teste de exposição direta aplicado ao P6 (Óxido de Zinco e Solução Salina) em diferentes intervalos de tempo.

Microrganismos padrões	Intervalos de Tempo					
	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>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Atividade da pasta	IN	IN	IN	IN	IN	IN

(-) Resultado negativo = Ausência de turvação = Ausência de crescimento microbiano = Efetividade do medicamento.
 (+) Resultado positivo = Presença de turvação = Presença de crescimento microbiano = Inefetividade do medicamento.
 (IN) = Inefetividade do medicamento no intervalo de tempo avaliado.
 (+++) = Os sinais representam a avaliação em triplicata das pontas de papel.

evidenciou ausência de turvação no meio de cultura. O controle positivo indicou presença de turvação, na leitura 24h para todos os microrganismos padrões avaliados. A análise desse resultado foi macroscópica e microscópica, pelo Método de Coloração de Gram (MCG). Os resultados apresentados nos quadros, correspondem à leitura 120h do experimento.

Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar componentes isolados e combinados da pasta CTZ contra diferentes microrganismos padrões, e quais tiveram os maiores impactos. A alta prevalência de cáries dentárias não tratadas e traumas dentários em dentes decíduos frequentemente podem progredir para danos irreversíveis à polpa, levando a abscessos e fístulas. Em casos de necrose pulpar, a infecção polimicrobiana dos canais radiculares tipicamente mostra uma predominância de *Streptococcus* e microrganismos anaeróbicos^{18,19}. Este fato suporta o uso dos microrganismos selecionados no presente estudo, com base em suas características delineadas no quadro 2. Neste contexto, selecionar uma pasta como CTZ, que contém dois antibióticos, é um fator-chave para alcançar o sucesso no tratamento proposto. Além disso, é essencial que o clínico entenda suas características, limitações, efeito antimicrobiano, bem como a conveniência clínica que a pasta CTZ proporciona.

Sabe-se que os halos de inibição do crescimento microbiano expressam a capacidade de difusão do fármaco avaliado em meio de cultura sólido e o tamanho

depende da solubilidade e difusibilidade do fármaco testado. Por esse motivo, os halos podem não expressar efetivamente todo o potencial do agente antimicrobiano^{20,21}. A velocidade de difusão no ágar e o tamanho da zona de inibição do crescimento dependem de fatores como: concentração do ágar, temperatura, pH, características nutricionais, concentrações de íons no meio de cultura, espessura da camada de ágar e concentração do inóculo^{20,21}. Para minimizar possíveis interferências nos resultados, os procedimentos foram realizados por dois operadores, de forma asséptica e em triplicata.

Uma consideração deste estudo refere-se à avaliação da atividade antimicrobiana da pasta de CTZ e seus componentes sobre *Lactobacillus casei* usando o teste de difusão em ágar. Uma das dificuldades encontradas nestes experimentos foi a aplicação da técnica de semeadura pour-plate nesta avaliação. Foi observado em 6 placas semeadas com volume de 1 ml de inóculo em 20 ml de ágar suco de tomate, crescimento confluyente de colônias bacterianas no ágar, após 48h de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Entretanto, a formação de halos de inibição ou halos de difusão ao redor das cavidades preenchidas com o fármaco teste não foi observada nestes resultados. A razão pela qual isso impediu a difusão livre do medicamento sob o ágar não foi esclarecida neste estudo. A confirmação da presença de crescimento microbiano foi realizada por meio de observação microscópica do meio de cultura, usando MCG como parâmetro.

Dessa forma, optou-se por realizar a semeadura por espalhamento. Utilizando essa técnica, distribuiu-se um volume de

0,1 ml de inóculo sobre toda a superfície do ágar tomate, com auxílio de uma alça de Drigalski. Após o período de incubação correspondente a 48 horas, observou-se a formação de halos ao redor dos fármacos avaliados. Esses halos não eram completamente translúcidos, como frequentemente é observado em zonas de inibição do crescimento microbiano. Embora o caldo de suco de tomate tenha sido cuidadosamente manipulado pelos operadores para preparar a suspensão microbiana, também foi observada a existência de resíduos de polpa de tomate, que, depositados no ágar, dificultaram a interpretação dos resultados na região interna dos halos formados.

Dessa forma, foi necessário então averiguar a presença de colônias bacterianas nesta região por meio da coleta de uma porção deste resíduo localizado próximo ao medicamento avaliado, com o auxílio de alça de platina em um movimento de arraste. Este material foi corado pelo MCG e analisado microscópicamente. A averiguação foi realizada em três placas, para os 6 grupos de medicamentos. Como todo o experimento foi realizado em triplicata, no total foram avaliadas 18 lâminas, sendo confirmado a presença de colônias do microrganismo testado no interior dos halos.

Com base nessas observações, foram avaliados seis discos de papel contendo os antimicrobianos tetraciclina (30mcg) e cloranfenicol (30mcg), com o intuito de conhecer a susceptibilidade desses antimicrobianos (dissociados da pasta) sobre os *Lactobacillus casei*, pelo método de disco-difusão. O experimento foi realizado em três placas de Petri, semeadas por

espalhamento em ágar tomate, com volume de 0,1 ml de inóculo. Os discos contendo os antibióticos a serem testados (3 para cada antimicrobiano), foram depositados sobre o ágar e incubados por 48h a 37°C, seguindo a leitura e a medida dos halos de inibição com régua milimetrada, a qual foi comparada com as medidas fornecidas pelos produtores dos discos.

Por meio deste teste, observou-se que *Lactobacillus casei* foram resistentes ao cloranfenicol e intermediariamente sensíveis à tetraciclina. A presença de colônias dentro do halo formado ao redor das cavidades preenchidas com o medicamento pode estar relacionada à resistência apresentada por este microrganismo aos antimicrobianos avaliados. Além disso, a tetraciclina e o cloranfenicol, quando combinados, conferiram à pasta maior atividade antimicrobiana em relação aos seus componentes avaliados separadamente, conforme proposto por Cappiello (1964)¹⁰. A presença de sinergismo nessa interação entre dois antibióticos bacteriostáticos foi observada para todos os microrganismos avaliados, com exceção da avaliação de *Escherichia coli*, na qual não houve diferença significativa entre as médias dos grupos P1 e P3. Os dados coletados na avaliação de *Lactobacillus casei* não foram submetidos à análise estatística, pois não houve formação de halos de inibição.

O grupo P6 (óxido de zinco e solução salina) não apresentou atividade antimicrobiana na avaliação de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus mutans*. Neste caso, observou-se apenas a formação de halo de difusão do próprio medicamento. Para obter uma confirmação mais fidedigna

sobre se haveria ou não crescimento microbiano, uma porção do ágar foi coletada da zona interna deste halo, que foi então introduzida em meio de cultura líquido (caldo BHI ou meio específico) e levada para incubação em estufa bacteriológica a 37°C/48h. Após MCG, o material foi analisado em microscopia óptica para visualização de colônias bacterianas.

Para todos os microrganismos avaliados, o grupo P3 apresentou maior atividade antimicrobiana em relação ao grupo P2. Apenas na avaliação do *Streptococcus mutans* não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias desses grupos. Considerando esses resultados, vale destacar que a ausência de algum componente da pasta pode influenciar na atividade antimicrobiana, como evidenciado neste estudo. O cloranfenicol, por exemplo, tem amplo espectro contra bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e seu mecanismo de ação ocorre pela inibição do processo de síntese proteica bacteriana^{22,23}. A tetraciclina, por sua vez, é um agente bacteriostático de amplo espectro que também inibe a síntese de proteínas bacterianas. Por outro lado, a tetraciclina apresenta desvantagens relacionadas ao potencial de pigmentação da coroa e desenvolvimento de hipoplasia do esmalte no pré-molar sucessor devido à sua alta afinidade por tecidos calcificados^{15,24}. Além disso, a coloração amarelada inerente e consequente escurecimento dos dentes, fato que pode ser desvantajoso e desestimular seu uso em áreas estéticas, como incisivos superiores. Para amenizar essas desvantagens, a remoção, substituição ou redução da proporção de tetraciclina pode ser uma alternativa interessante e viável. Para isso,

estudos adicionais *in vitro* e clínicos são necessários para avaliar as propriedades antimicrobianas e a eficácia do tratamento endodôntico com o uso de uma pasta modificada.

Os resultados obtidos mostraram que os grupos P1, P2, P3, P4 e P5 foram eficazes contra os seis microrganismos padrões, em todos os intervalos de tempo avaliados. Em relação às pastas controle sem antibióticos (P4, P5 e P6), o grupo P6 foi o único a demonstrar ineficácia contra os microrganismos testados, pois o meio de cultura apresentou turbidez em 5 minutos, o que nos levou a considerar que esse resultado poderia estar relacionado à ausência de eugenol em sua composição.

Outro resultado derivado deste estudo refere-se ao fato de que os grupos P4 e P5 apresentaram médias com valores muito próximos, estatisticamente não significativos, mesmo com a discrepância observada no volume de eugenol entre esses grupos (0,6 ml no P4 e 0,0006 ml no P5). Dessa forma, a eficácia antimicrobiana observada no grupo P4 foi atribuída à presença do eugenol em sua composição, uma vez que o óxido de zinco avaliado separadamente (P6) não apresentou eficácia sobre os microrganismos padrões testados. O eugenol possui ação bactericida, devido à sua alta afinidade pela membrana plasmática (lipossolubilidade) e sua capacidade de inibir a respiração e a divisão celular bacteriana^{25,26}.

Em última análise, embora este estudo *in vitro* tenha apresentado resultados interessantes, algumas limitações metodológicas devem ser mencionadas. Entre elas, uma limitação considerável se refere ao fato de que as bactérias não

são encontradas isoladas, mas sim em consórcios. Portanto, os achados devem ser interpretados com cautela, pois não sabemos se os resultados da exposição *in vitro* a cepas individuais serão os mesmos que a resposta da reação do sistema de canal necrótico. Além disso, a resposta de cada organismo pode variar e influenciar o prognóstico dentário. De forma geral, novos estudos clínicos devem ser realizados com base em nossos achados para confirmar as implicações clínicas.

Conclusión

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que a combinação de todos os componentes da pasta de CTZ (cloranfenicol, tetraciclina e óxido de

zinco - proporção 1:1:2, respectivamente) e o eugenol como veículo de manipulação, apresentou atividade antimicrobiana contra microrganismos *in vitro*. Entretanto, quando os componentes da pasta CTZ foram avaliados separadamente, eles apresentaram menores diâmetros médios de halos de inibição em relação à combinação de todos os fármacos. Adicionalmente, o uso individual do eugenol apresentou eficácia antimicrobiana, enquanto a ausência deste produto testado isoladamente não apresentou eficácia contra microrganismos.

Conflicto de Interesses

Os autores declaram não ter conflitos de interesse em relação à publicação deste artigo.

Referências 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. Tratamentos 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