



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana de duas
pastas obturadoras de canais radiculares de dentes
decíduos

Aluna: Mariana Minatel

Orientadora: Regina Maria Puppim-Rontari

Ano de Conclusão do Curso: 2010

Piracicaba SP

2010

Mariana Minatel

Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana de duas
pastas obturadoras de canais radiculares de dentes
decíduos

Monografia apresentada ao
curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba- UNICAMP, para
obtenção do Diploma de
Cirurgião-Dentista

Orientadora: Regina Maria Puppim-Rontani

Piracicaba

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

Minatel, Mariana.

M661a Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana de duas pastas obturadoras de canais radiculares de dentes decíduos / Mariana Minatel. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

23f. : il.

Orientador: Regina Maria Puppini-Rontani.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontopediatria. I. Puppini-Rontani, Regina Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre abrir portas e iluminar meu caminho.

À professora Regina Maria Puppini-Rontari, por ter participado dessa caminhada, dando orientação e atenção. À pós-graduanda Andréia Bolzan, pela paciência e dedicação, pois esteve sempre presente, esclarecendo as dúvidas, orientando e incentivando. À Janaína Sardi, pela ajuda, explicações e contribuição. Pessoas sem às quais não seria possível a realização desse trabalho!

A todos os professores da FOP, que não mediram esforços para nos trazer o que há de melhor para nosso crescimento profissional.

Aos meus pais, José Angelo e Magali, meus exemplos de vida, que sempre me deram apoio no caminho que escolhi e força para não desistir. Os responsáveis pelo que sou e tudo que conquistei até hoje. À minha irmã, Laís, que sempre esteve do meu lado me apoiando em todas as decisões, crescendo comigo. E a vários outros familiares que sempre me incentivaram.

Ao meu namorado e amigo, Rodrigo, pela paciência e o carinho durante esses anos, com horas de desabaços e conselhos. E aos meus amigos, que me compreenderam e apoiaram nos momentos de ausência.

E a todos meus amigos da turma 51 da FOP, por esses 4 anos que foram maravilhosos; aos verdadeiros e eternos amigos que conquistei nesses anos de convivência! Obrigada por todos os momentos, e por tudo que crescemos juntos!

Sumário

Resumo	06
Abstract	07
Introdução	08
Objetivo	10
Materiais e métodos	11
Resultados	13
Discussão	14
Conclusão	17
Referências	18
Anexos	21

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de duas pastas obturadoras de canais radiculares de dentes decíduos, Vitapex e Calcipex, em espécies microbianas comumente encontradas em infecções endodônticas (*Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis*), utilizando o teste de difusão em ágar. **Materiais e métodos:** foram confeccionados em placas de BHI (Infusion Heart Brain) quatro poços em pontos equidistantes e imediatamente preenchidos com os materiais obturadores Vitapex e Calcipex. O digluconato de clorexidina a 1% (CHX) e água destilada foi usado como controles, positivo e negativo, respectivamente. Após a incubação das placas a 37 ° C por 24 h, o diâmetro das zonas de inibição de crescimento microbiano produzido em torno dos poços foi medida (em milímetros) com um paquímetro digital com luz refletida. Esse teste foi realizado em triplicata e os dados obtidos submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** Ambas as pastas tiveram atividade antimicrobiana, porém Calcipex foi mais eficiente para a maioria das cepas. O halo formado nos experimentos de *S.mutans* e *S.sanguinis* foi similar para ambas as pastas. Podemos sugerir que Calcipex teve maior poder antimicrobiano com relação aos microrganismos estudados.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the in vitro antimicrobial activity of two root canal filling pastes in primary teeth, Vitapex and Calcipex, in microbial species commonly found in endodontic infections (*Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* *Streptococcus sanguinis*), using the agar diffusion test. **Materials and Methods:** This was made on plates of BHI (Brain Heart Infusion) wells in four equidistant points and immediately filled with the sealers and Vitapex Calcipex. The chlorhexidine gluconate 1% (CHX) and distilled water was used as controls, positive and negative, respectively. After incubation of plates at 37 ° C for 24 h, the diameter of the zones of microbial growth inhibition produced around the wells was measured (in millimeters) with a digital caliper with reflected light. This test was performed in triplicate and data were submitted to ANOVA and Tukey test ($\alpha = 0.05$). **Results:** Both pastes had antimicrobial activity, but Calcipex was more efficient for most strains. The halo formed in the experiments of *S. mutans* and *S. sanguis* was similar for the both pastes. We suggest that Calcipex had the highest antimicrobial property with respect to the studied microorganisms.

1) Introdução e Revisão de literatura

As espécies da microbiota endodôntica quando analisadas separadamente não são patogênicas, mas associadas a alguns fatores podem vir a causar danos. As interações microbianas, assim como as pressões seletivas que ocorrem em consequência da oferta reduzida do oxigênio e de nutrientes e a defesa do hospedeiro, que pode encontrar-se deficiente (Estrela et al, 2000), contribuem para maior patogenicidade desses microrganismos. Nessas infecções polimicrobianas são raros os microrganismos aeróbios, sendo a maioria anaeróbia e alguns anaeróbios facultativos (Sundqvist et al, 1998). Em algumas pesquisas também foi detectada a presença de fungos (Peciulienė et al, 2000; Sundqvist et al, 1998; Waltimo et al, 1997).

O tratamento endodôntico de dentes decíduos é de suma importância para que se possa preservar a dentição primária e assim promover desenvolvimento craniofacial adequado, uma oclusão normal e qualidades estéticas (Cox et al, 1978).

Para garantir sucesso no tratamento endodôntico, especialmente em dentes decíduos por suas complicações anatômicas, somente a instrumentação do canal não é o bastante. Faz-se necessário o uso de pastas obturadoras para ter acesso onde não houve um bom preparo mecânico (Fabiane et al, 2009). Além disso, para garantir a boa eficácia da pasta obturadora são necessárias algumas propriedades como sua reabsorção ser proporcional à reabsorção do dente, ser inofensiva ao periápice e ao germe do dente permanente, ser anti-séptica, radiopaca, preencher facilmente o canal e aderir às paredes, ser facilmente

removida se necessário e não alterar a cor do dente. (Rinfkin et al, 1980; Mortazavil & Mesbahi, 2004)

Há diversos tipos de pastas obturadoras de canais radiculares no mercado, entre elas as pastas à base de hidróxido de cálcio. Este componente age nos tecidos e bactérias pela dissociação dos íons cálcio e hidroxila. As hidroxilas podem alterar atividade enzimática, inativando-a. Além disso, agem nas enzimas da membrana citoplasmática, tendo assim um vasto campo de atuação sobre os microorganismos. (Estrela & Holland, 2003)

No entanto, frente à variedade de materiais obturadores existentes no mercado, e com o intuito de utilizar um material eficaz no tratamento endodôntico, há a necessidade de estudos para a avaliação das propriedades antimicrobianas desses materiais.

2) PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de duas pastas obturadoras de canais radiculares de dentes decíduos a base de hidróxido de cálcio, Vitapex® e Calcipex II®, em 6 espécies microbianas comumente encontradas nas infecções endodônticas.

3) MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos utilizados no experimento

Seis cepas microbianas obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas neste estudo: *Candida albicans* (ATCC 90028) *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541; cocos gram-positivos); *Streptococcus mutans* (ATCC 25175; cocos gram-positivos), *Escherichia coli* (ATCC 10538; bacilo gram-negativas), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538; cocos gram-positivos), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556, cocos gram-positivos). Antes de cada experimento as amostras foram cultivadas aerobicamente a 37°C por 18 horas em BHI caldo (Brain Heart Infusion Broth Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) .Após 18 horas de incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,9% e ressuspendidas em BHI caldo, padronizadas a 10³ cels/mL através de um espectrofotômetro (Bausch & Lomb Spectronic 20, San Pablo, Calif, USA) a 550nm.

Pastas Obturadoras

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos materiais Vitapex® (Neo-Dental, Tokyo, Japan) e Calcipex II® (Nippon Sika-Yakuhin, Shimonoseki, Japan) foi avaliada pela técnica Pour Plate, utilizando-se o Digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX) e água destilada como controles positivo e negativo, respectivamente.

Técnica Pour Plate e confecção dos poços:

Para a técnica de Pour Plate, 1ml do inóculo foi transferido a um tubo de ensaio contendo 19ml de Ágar fundido - BHI (45 °C), ambos foram misturados e dispensados em placas de petri estéreis. Após solidificação do ágar, os poços foram confeccionados em pontos eqüidistantes, utilizando matrizes metálicas autoclavadas de 5 mm de diâmetro, num total de quatro poços por placa. Imediatamente após a confecção das perfurações os poços foram preenchidos totalmente com as pastas obturadoras e materiais de controle. As placas de petri foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas para ocorrer a pré-difusão das substâncias e, posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, o diâmetro das zonas de inibição do crescimento microbiano formado ao redor dos poços foi medido em milímetros com um paquímetro digital (Mitutoyo, Tokyo, Japão), sob luz refletida.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados obtidos submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4) RESULTADOS

Os resultados obtidos através da mensuração (mm) dos halos de inibição estão expostos na Tabela 01. Estatisticamente não houve diferença entre a Clorexidina (controle positivo) e a Pasta Calcipex II para todos os microorganismos. Enquanto a pasta Vitapex apresentou os piores resultados, não havendo diferença estatística do controle positivo apenas para os microorganismos *S. mutans* e *S. sanguinis*. No controle negativo utilizado não houve formação de halo, enquanto no controle positivo obtivemos as maiores inibições.

Tabela 01. Médias do halo de inibição(mm) dos materiais testados

	Vitapex	Calcipex	Clorexidina
<i>S. mutans</i>	0,342 ^A	0,570 ^A	0,944 ^A
<i>S. sanguinis</i>	0,389 ^A	0,582 ^A	0,904 ^A
<i>C. albicans</i>	0,326 ^B	0,779 ^A	0,904 ^A
<i>E. faecalis</i>	0,382 ^B	0,665 ^A	0,718 ^A
<i>S. aureus</i>	0,407 ^B	0,683 ^A	0,688 ^A
<i>E. coli</i>	0,381 ^B	0,577 ^A	0,560 ^A

Letras maiúsculas iguais não denotam diferença estatística considerando os dados apresentados nas linhas ($p < 0,01$)

5) DISCUSSÃO

As propriedades do hidróxido de cálcio foram definidas por Estrela & Holland (2003) os quais consideraram a dentina como a melhor proteção pulpar e confirmaram a capacidade do hidróxido de cálcio de induzir a formação de barreira mineralizada sobre o tecido pulpar. Ainda, segundo esses autores é necessário, sempre que possível, aguardar o tempo de ação recomendado do hidróxido de cálcio para manifestar seu potencial de ação contra os microorganismos presentes em infecções endodôntica, haja vista que a manutenção e uma elevada concentração de íons hidroxila podem alterar a atividade enzimática das bactérias e inativá-la. Além disso, o local de ação dos íons hidroxila e cálcio incluem as enzimas na membrana citoplasmática bacteriana, que são similares, independentemente das características morfológicas, tintoriais e respiratórias desses microorganismos, sendo assim, essa medicação têm o efeito similar em bactérias aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas e gram-negativas. Outra importante vantagem do uso do hidróxido de cálcio como um cimento temporário é a promoção da limpeza dos condutos, proporcionando melhoras no processo de cicatrização periapical.

No presente estudo, analisamos a atividade antimicrobiana de duas pastas obturadoras à base de hidróxido de cálcio. Vitapex, composta basicamente por hidróxido de cálcio (30,3%), iodofórmio (40,4%) e óleo de silicone (22,4%); e Calcipex II composta por hidróxido de cálcio (24%), sulfato de bário (24%), água destilada (52%), a qual apresentou melhores resultados, ou seja, maior halo de inibição para a maioria dos microrganismos testados, corroborando com os achados de Amorim et al. (2006), os quais analisaram a ação do Vitapex e outras 4 pastas obturadoras de dentes decíduos (Guedes-Pinto, ZOE, pasta de hidróxido de cálcio e Cloranfenicol+ tetraciclina+ ZOE) pelos testes de difusão em ágar e de exposição direta. Segundo esses autores a exposição direta de todas as pastas apresentou atividade antimicrobiana após 24 horas. Porém, no

teste de difusão em ágar, a pasta Vitapex não apresentou halo de inibição, os autores justificam essa diferença nos resultados dos testes, pois o halo de inibição da atividade antimicrobiana depende da solubilidade e difusão da substância no meio, e que para o teste de difusão em Agar, deve haver rigorosa padronização da densidade do inóculo, viscosidade do Agar, tamanho e quantidade da espécie por placa para se obter resultados confiáveis, Outros fatores como pré-incubação, secas meio de cultura e manutenção por períodos que excedam o tempo ideal podem produzir resultados duvidosos. Outro resultado negativo para Vitapex foi encontrado em um trabalho realizado por Tchaou et al.(1995), os quais utilizaram o método de difusão em ágar, e classificaram os resultados obtidos pela ação antimicrobiana das pastas em 3 grupos: I- com forte ação antimicrobiana, II- ação intermediária e III- mínima ou nenhuma ação. Vitapex se enquadrou na 3ª categoria, juntamente com hidróxido de cálcio + água estéril e a vaselina (controle negativo). Uma pasta à base de hidróxido de cálcio utilizada nesse estudo (hidróxido de cálcio + paraclorfenol canforado) se enquadrou na categoria de forte ação antimicrobiana. Blanscet et al. (2008) compararam pelo método de difusão em Agar a atividade antimicrobiana de cinco concentrações de hidróxido de cálcio com três veículos diferentes: hidróxido de cálcio + soro estéril em concentrações de 60%, 50% e 40%, e as pastas Ultracal® (35% com base aquosa de metilcelulose) e Vitapex® (hidróxido de cálcio 30,3%, iodofórmio e óleo de silicone). A concentração que se mostrou mais eficiente foi a de 60%, seguida da 50%; porém Ultracal® (35%) mostrou-se mais efetiva que 40%, e Vitapex® apresentou os piores resultados. Provavelmente esses resultados estejam relacionados a composição das pastas obturadoras e não somente a concentração de hidróxido de cálcio.

Estrela et al.(2006) verificaram a significância da associação do iodofórmio (componente da pasta Vitapex) ao hidróxido de cálcio em relação à atividade antimicrobiana pelo método de difusão em Agar e exposição direta e concluíram que o hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico apresentou similar atividade antimicrobiana comparada a associação de hidróxido de cálcio ao iodofórmio e soro, e o iodofórmio associado ao soro não apresentou nenhuma

atividade antibacteriana no teste de exposição em Agar e em exposição direta foi ineficiente contra *Bacillus subtilis* e a associação dos microorganismos. Em uma revisão bibliográfica realizada por Aydos & Milano (1984) sobre o uso de iodofórmio foi constatado que este material não tem ação antimicrobiana *in vitro*, porém os resultados obtidos *in vivo* foram divergentes, podendo sugerir a ação do iodofórmio através da estimulação biológica do organismo. A literatura sugere ainda, que sua ação se dá pela liberação de iodo, porém é necessário mais estudos para esclarecer a sua ação quando empregado na odontologia.

Contrariando os resultados deste estudo *in vitro*, trabalhos realizados *in vivo* demonstraram bom desempenho clínico de Vitapex. Nurko & Garcia-Godoy (1999) analisaram clinicamente a eficácia de Vitapex no tratamento de dentes decíduos e segundo os critérios utilizados (dente indolor, sem mobilidade patológica, e a gengiva saudável e sem fístula) os autores relataram alta taxa de sucesso no uso deste material. Resultado semelhante foi encontrado por Mortazavi & Mesbahi (2004), que compararam Vitapex com pasta ZOE, onde ainda a pasta à base de hidróxido de cálcio foi mais eficiente que a zinco eugenólica. Nakorncha et al (2010), analisaram clínica e radiograficamente a pasta Vitapex quando comparada a pasta 3Mix. Apesar do maior desempenho clínico observado pela 3Mix, a pasta Vitapex obteve sucesso no tratamento endodôntico. Os autores preconizam que esse resultado possa estar relacionado ao prognóstico ruim dos dentes selecionados para o tratamento.

Na literatura não há trabalhos analisando a ação antibacteriana de Calcipex II, mas uma das razões para sua maior eficiência comparada ao Vitapex poderia ser o veículo utilizado em cada pasta, que segundo trabalho realizado por Estrela et al. (1999) veículos hidrossolúveis (no caso de Calcipex II a água destilada) podem acelerar a dissociação iônica e difusão e interferir nos sistemas enzimáticos e tecidos bacterianos, acelerando assim a atividade do hidróxido de cálcio. Já veículos oleosos, como encontrado em Vitapex, podem dificultar a dissociação iônica do hidróxido de cálcio, atrapalhando a atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio.

6) CONCLUSÃO

Através do teste realizado no presente trabalho as duas pastas apresentaram atividade antimicrobiana, no entanto, a pasta Calcipex II mostrou-se mais efetiva quando comparada à Vitapex.

REFERÊNCIAS

- Amorim Lde F , 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.
- Aydos J.H., Milano N.F.. Revisão bibliográfica sobre o uso do iodofórmio em Endodontia. Rev Facul Odontol Porto Alegre. 1984; 26: 46-51.
- Blanscet ML, Tordik PA, Goodell GG. An agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of calcium hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. J Endod. 2008 Oct;34(10):1246-8. Epub 2008 Aug 23.
- Bonow MLM, Guedes-Pinto AC, Bammann LL. Antimicrobial activity of drugs used in pulp therapy of deciduos teeth. Braz Endod J 1996;1:44-48.
- Cox ST, Hembree JH and Mc Knight JP. The bactericidal potential of various endodontic materials for primary teeth. Oral Surg 45: 947-954 – 1978
- Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. Int Endod J 2000;34:416-418.
- Estrela C, Estrela CRA, Hollanda ACB, Decurcio DA, Pécora JD. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. J Appl Oral Sci 2006;14:33-37
- Estrela C, Holland R Calcium Hydroxide: study based on scientific evidences. J Oral Applied Science 2003;11:269-282
- Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CRA, Bammann L.L.. Effect of Vehicle on Antimicrobial Properties of Calcium Hydroxide Pastes. Braz Dent J (1999) 10(2):63-72

- Estrela C, Estrela CRA, Bammann LL, Pecora JD Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. J Endod. 2001 Dec;27(12):720-3.
- Holland R, Otoboni-Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan-Jr E. Periapical tissue repair with diferents calcium hydroxide associations - study in dog' s teeth. Rev Ass Paul Cir Dent 1999;53:327-331
- Mani SA, Chawla HS, Tewari A, Goyal A. Evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary teeth. J Dent Child 2000;67:142-147
- Miyagak DC, Carvalho EMOF, Robazza CRC, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. Braz. oral res. vol.20 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2006
- Mortazavil M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. International Journal of Paediatric Dentistry 2004; 14:417–424
- Nair PNR, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: A long-term ight and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990;16:580-8.
- Nakornchai S, Banditsing P, Visetratana N. Clinical evaluation of 3Mix and Vitapex_ as treatment options for pulpally involved primary molars. International Journal of Paediatric Dentistry 2010; 20: 214–221
- Nurko C, Garcia-Godoy F. Evaluation of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex[®]) in root canal therapy for primary teeth. J Clin Ped Dent 1999;23:289-294.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in Lithuanian population. J Endod. 2000;26:593-5.

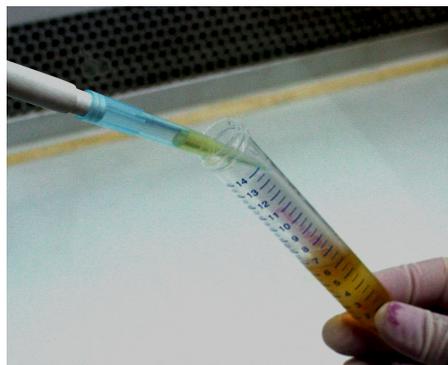
- Pabla T, Gulati MS, Mohan U. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials for primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 1997;15:134-140
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod.* 2000;26:593-5.
- Piva F, Faraco Junior IM, Feldens CA, Estrela CRA. Antimicrobial action of root canal filling materials for primary teeth using the agar diffusion method: an In Vitro Study. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa*, 9(1):13-17, jan./abr. 2009.
- Rinfkin A. A simple, effective safe technique for the root canal treatment of abscessed primary teeth. *J Dent Child* 1980; 47:435-441
- Siqueira Junior JF , Favieri A, Gahyva SMM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod.* 2000;26:274-7.
- Soares, JA; Leonardo, MR; Tanomaru Filho, M; Silva, LAB; Ito, IY. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated p-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. *Braz. dent. j;*18(1):8-15, jan.-mar 2007.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:86-93.
- Tchaou W, Turng B, Minah GE, Coll JA. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. *Pediat Dent* 1995;17:351-355
- Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapas-alo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30:96-101.

ANEXO:

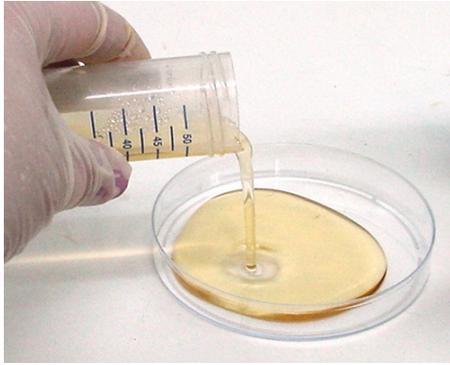
Metodologia:

1. Pasta Vitapex® (Neo-Dental, Tokyo, Japan)
2. Paste Calcipex II® (Nippon Sika-Yakuhin, Shimonoseki, Japan)
3. Clorexidina 0,12%
4. Seleção dos microrganismos e Preparo do meio (BHI caldo)
5. Crescimento microbiano DO = 0,8
6. Crescimento microbiano inoculado em BHI Ágar (45°C)
(Técnica Pour Plate)

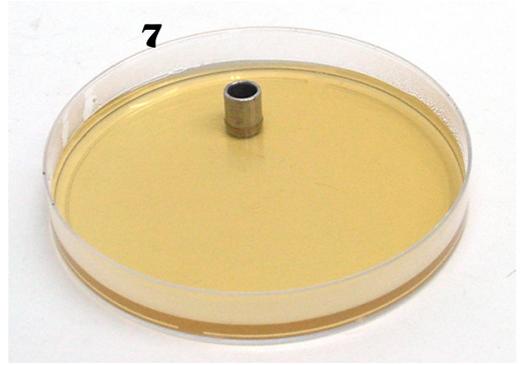
7. Confecção das placas
8. Perfurações padronizadas
9. Poços preparados para receber os materiais
10. Materiais sendo dispensados nos orifícios:
 - a. Pasta Vitapex®
 - b. Pasta Calcipex II ®
 - c. Clorexidina 0,12%
 - d. Placa Petri preparada



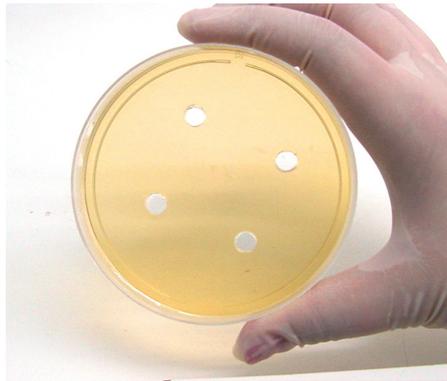
8



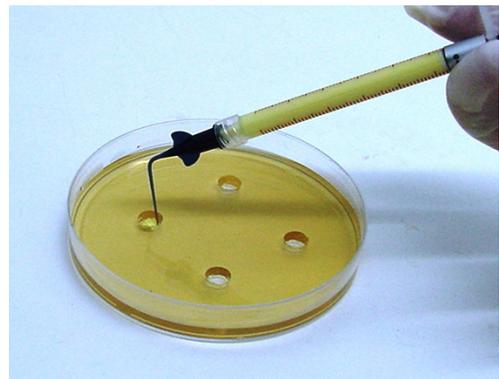
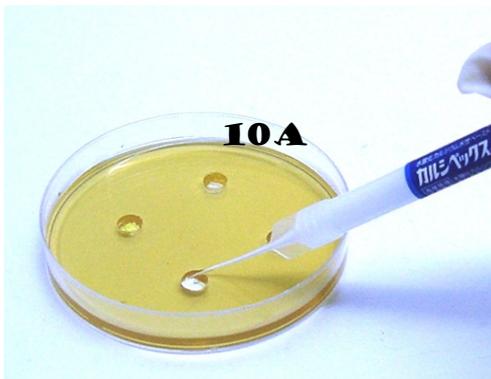
7



9



10B



10C

10D