

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FORMOCRESOL E DO PARAMONOCLOROFENOL CANFORADO

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FORMOCRESOL AND CAMPHORATED PARAMONOCHELOROPHENOL

Maria Alves Garcia Santos **SILVA***, Elismauro Francisco de **MENDONÇA****, Káthia Fernandes Muricy **RODRIGUES*****, César **BARIANI******, Geisa Badauy Lauria **SILVA*******

* Professora Adjunto do Departamento de Ciências Estomatológicas da Universidade Federal de Goiás. Mestre e Doutora em Diagnóstico Bucal.

**Professor Titular do Departamento de Ciências Estomatológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás; Coordenador do Serviço de Odontologia do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Mestre e Doutor em Diagnóstico Bucal – Pós-doutorado pela Universidade do Texas-EUA.

***Mestre em Odontologia, área de Clínica Odontológica. FO/UFG.

****Médico Hematologista Chefe do Serviço de Transplante de medula óssea do HAJ/ACCG.

***** Cirurgiã-dentista do Hospital Araújo Jorge - Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Mestranda em Odontologia da FO/UFG.

Endereço para correspondência: Káthia Fernandes Muricy Rodrigues, Av. Tocantins nº 1171 Apto 501-A, setor Aeroporto, cep: 74075100, Goiânia – GO, E-mail: kathiafr@uol.com.br Fone: (062) 3225-8545 / 8115-5675.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Este estudo visa orientar o clínico sobre a capacidade antimicrobiana do formocresol e paramonoclorofenol canforado, materiais frequentemente utilizados como curativo de demora no tratamento endodôntico de dentes decíduos com canais infectados, a fim de contribuir com evidências científicas para o estabelecimento de uma conduta cientificamente satisfatória para a denteição decídua.

RESUMO

Para compensar as deficiências da instrumentação de dentes decíduos, os medicamentos utilizados como curativo de demora assumem considerável importância no saneamento dos canais radiculares. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi investigar a ação antimicrobiana do formocresol e do paramonoclorofenol canforado através do método de difusão em ágar. Três cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*) e um fungo (*Candida albicans*) foram utilizados. Para o teste de difusão em ágar, 12 placas de Petri com 60mL de BHIA foram inoculadas com 300 mL das suspensões microbianas. Após a impregnação dos discos de papel filtro com 10 mL dos materiais experimentais, os mesmos foram colocados sobre a superfície do BHIA e mantidos por 1 hora em temperatura ambiente e incubados a 37°C por 48 horas. Os diâmetros dos halos de inibição microbiana foram medidos sobre os discos de papel contendo as substâncias. Os resultados demonstraram atividade antimicrobiana para os dois materiais testados, sendo que o formocresol apresentou halos de inibição significativamente maiores que o paramonoclorofenol canforado.

PALAVRAS-CHAVE: Dente decíduo, endodontia, cavidade da polpa dentária.

ABSTRACT

To compensate the deficiencies of biomechanical instrumentation of deciduous teeth, the use of

intracanal medicaments is very important to reduce microorganism from the root canals. Therefore, the objective of this study was to investigate the antimicrobial action of formocresol and camphorated paramonochlorophenol by agar diffusion test. Three species of bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*) and one fungus (*Candida albicans*) were used. For the agar diffusion test, 12 Petry plates with 60mL of BHIA were inoculated with 300 mL of the microbial suspension. After the impregnation of the filter paper discs with 10 mL of experimental materials, they were placed on the BHIA surface and maintained for 1 hour at room temperature before incubation at 37°C for 48 hours. The diameters of the antimicrobial inhibition zones were measured around paper discs containing the substances. The results showed antimicrobial activity for both materials tested; the formocresol displayed significantly larger inhibition zones than the camphorated paramonochlorophenol.

Keywords: Deciduous tooth, endodontics, dental pulp cavity.

INTRODUÇÃO

Os conhecimentos atuais da etiopatogenia da cárie dentária demonstram claramente a possibilidade do seu controle e prevenção. Apesar da redução na severidade e prevalência da doença, a presença de dentes com cavidades ou extensamente destruídos e com envolvimento pulpar ainda é observada em muitas crianças. Para que seja possível a preservação de dentes decíduos com comprometimento pulpar no arco dentário, muitas vezes faz-se necessária a realização de terapia endodôntica nos mesmos.

Quanto ao tratamento endodôntico de dentes decíduos, deve-se levar em consideração alguns fatores inerentes aos mesmos, de grande importância para o sucesso do tratamento, tais como: anatomia dos dentes decíduos, topografia dos canais radiculares e o processo de rizólise. Todos estes fatores dificultam o tratamento endodôntico de dentes decíduos.¹

Em função destas características peculiares, quando há comprometimento pulpar, principalmente de molares decíduos, microrganismos e suas toxinas, bem como resíduos da decomposição pulpar, instalam-se nos canais acessórios e secundários, dificultando sua remoção.¹ Somado a estes fatores, o depósito de dentina secundária associado ao processo de rizólise limita a manipulação dos canais radiculares de dentes decíduos, inviabilizando tratamento endodôntico em uma única sessão.

Assim, a utilização de curativo de demora assume considerável importância. O emprego da medicação intracanal no intervalo das sessões do tratamento endodôntico potencializa a

sanificação do sistema de canais radiculares. Portanto, o fato de possuir atividade antimicrobiana é fundamental em um medicamento para uso intracanal.²

Corrêa Brusco et al.³ (2002) constataram que 52% das 86 Faculdades de Odontologia Brasileiras pesquisadas utilizam como rotina curativo de demora durante o tratamento endodôntico de dentes decíduos. Segundo os autores, as substâncias utilizadas como curativo de demora em dentes decíduos são: formocresol, paramonoclorofenol canforado (PMCC), pasta Guedes-Pinto, hidróxido de cálcio p.a. associado ao propilenoglicol ou ao soro fisiológico, Otosporin®, tricresol formalina e pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol).

O formocresol, introduzido em 1904, é um medicamento amplamente utilizado na terapia pulpar de dentes decíduos. É derivado de dois componentes ativos: o formaldeído e o cresol, ambos com propriedades químicas distintas. O formaldeído age sobre as proteínas da polpa e o cresol atua na membrana celular. Assim como o formaldeído, o cresol é um desinfetante forte, porém não possui propriedades de fixação.⁴ Segundo Kramer et al.⁵ (2000), o sucesso clínico no emprego do formocresol está relacionado à sua ação germicida e propriedades de fixação.

Já o paramonoclorofenol canforado surgiu em 1929, quando Walkhoff associou cânfora ao paramonoclorofenol, com o objetivo de diminuir seu potencial irritante. De acordo com Batista e Berger⁶ (2002) este material está fundamentado nas propriedades anti-sépticas do fenol, um germicida eficaz.

Frente ao exposto, acreditamos ser oportuna a realização de pesquisas para verificar a

atividade antimicrobiana de medicamentos freqüentemente utilizados como curativo de demora de dentes decíduos, a fim de fornecer as bases necessárias para o estabelecimento de uma conduta cientificamente satisfatória. Neste sentido, este estudo tem como objetivo investigar a ação antimicrobiana do formocresol e do paramonoclorofenol canforado através do método de difusão em ágar.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras Microbianas

A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Microbiologia e Mutagênese da Universidade Luterana do Brasil (Canoas/RS), onde foram utilizadas culturas isoladas obtidas do laboratório do Instituto Nacional Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As culturas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

A preservação das culturas microbianas foi realizada através de repiques, em meio Brain

Heart Infusion Agar (BHIA), que após o período de incubação adequado foram mantidas em geladeira à temperatura de 4°C.

Materiais Experimentais

Para avaliação de atividade antimicrobiana foram utilizados os materiais: Formocresol NA (INODON, Porto Alegre, RS, Brasil) e Paramonoclorofenol canforado (IODONTEC, Porto Alegre, RS, Brasil).

Técnica de Difusão em Ágar

Cada cepa microbiana foi semeada sobre o meio de cultura semi-sólido BHIA e incubada à temperatura de 37°C por 48 horas. Após este período, as colônias microbianas foram suspensas em 5mL de solução fisiológica esterilizada, ajustadas com o mesmo diluente até se obter a turvação referente ao tubo número 1 da Escala de McFarland (aproximadamente 3x10⁸ células por mL).

Foram utilizadas 12 placas de Petri de 14 x 15cm esterilizadas e descartáveis, nas quais foram vertidos 60mL do meio BHIA esterilizado,

Tabela 1- Medida dos halos de inibição microbiana (mm) e leitura da presença ou ausência de turvação nos caldos.

Microrganismos	Placa	Formocresol		PMCC		Grupo controle	
		Halo de inibição	Turvação	Halo de inibição	Turvação	Halo de inibição	Turvação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	11,5	Ausente	3,0	Ausente	0	-
	II	11,5	Ausente	3,0	Ausente	0	-
	III	11,0	Ausente	4,0	Ausente	0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	I	15,0	Ausente	2,0	Ausente	0	-
	II	15,0	Ausente	3,0	Ausente	0	-
	III	12,0	Ausente	2,0	Ausente	0	-
<i>Bacillus Subtilis</i>	I	16,0	Presente	9,0	Presente	0	-
	II	16,0	Ausente	8,5	Ausente	0	-
	III	14,5	Ausente	10,5	Ausente	0	-
<i>Candida Albicans</i>	I	13,0	Ausente	9,0	Ausente	0	-
	II	12,5	Ausente	9,0	Ausente	0	-
	III	12,5	Ausente	9,0	Ausente	0	-

promovendo uma espessura de 4mm de ágar em cada placa.

Procedeu-se então a contaminação das placas com os respectivos microrganismos, utilizando uma pipeta com ponteiros esterilizados e descartáveis. Foi dispensado em cada placa um inóculo de 300 mL da suspensão microbiana, que foi imediatamente espalhado sobre a superfície do meio com o auxílio de um swab esterilizado.

Em seguida realizou-se a impregnação dos 24 discos de papel filtro de 6mm de diâmetro com os materiais experimentais, dispensando-se 10 mL de solução para cada disco com auxílio de uma pipeta. Os discos foram transferidos para as placas previamente identificadas com o nome de cada microrganismo, sendo dispostos de modo equidistante, semelhante ao recomendado para realização de antibiograma. No centro das placas foi colocado um disco esterilizado não embebido nos materiais experimentais. Deste modo, cada placa continha 3 discos, sendo 1 impregnado com formocresol, 1 impregnado com paramonoclorofenol canforado e 1 sem nenhuma solução (grupo controle).

As placas permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente, sendo transferidas para estufa bacteriológica permanecendo incubadas a 37° C por 48 horas.

Leitura dos Resultados

Após o período de incubação de 48 horas foi realizada a leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada disco. A medida corresponde à distância entre a borda do disco e a borda externa da faixa que se apresentava com aspecto liso e transparente evidenciando ausência de crescimento

bacteriano. A mensuração foi realizada com um paquímetro milimetrado. Utilizou-se duas medidas perpendiculares entre si, sendo obtida a média para cada disco.

Teste de Contra-Prova

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi coletado um pedaço da faixa de inibição de cada líquido testado, com auxílio de uma alça bacteriológica. O pedaço foi colocado em um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo BHI esterilizado e mantido em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas. Após este período foi verificada a presença ou ausência de turvação no caldo. A ausência de turvação do caldo confirmava a atividade antimicrobiana do material experimental sobre o microrganismo testado. Todo o experimento foi realizado em triplicata sob condições assépticas e conduzido pelo mesmo operador.

Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o software Statistical Package for Social Sciences 8.0, que calculou a mediana, os valores mínimos e máximos e a amplitude interquartilica (IQ) da variável tamanho do halo. Para verificar se houve diferença entre os materiais em relação ao tamanho do halo foi empregado o teste Mann-Whitney, em função da distribuição anormal desta variável.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as medidas dos halos de inibição de crescimento microbiano para os microrganismos *Pseudomonas*

Tabela 2 - Tamanho dos halos de inibição microbiana (mm) e comparação entre os materiais estudados.

Material	n	Tamanho do halo de inibição				Valor de p*
		Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude Interquartilica (IQ)	
<i>Formocresol</i>	12	11,0	16,0	12,7	11,6 - 15,0	< 0,001
<i>PMCC</i>	12	2,0	10,5	6,2	3,0 - 9,0	

promovendo uma espessura de 4mm de ágar em cada placa.

Procedeu-se então a contaminação das placas com os respectivos microrganismos, utilizando uma pipeta com ponteiros esterilizados e descartáveis. Foi dispensado em cada placa um inóculo de 300 mL da suspensão microbiana, que foi imediatamente espalhado sobre a superfície do meio com o auxílio de um swab esterilizado.

Em seguida realizou-se a impregnação dos 24 discos de papel filtro de 6mm de diâmetro com os materiais experimentais, dispensando-se 10 mL de solução para cada disco com auxílio de uma pipeta. Os discos foram transferidos para as placas previamente identificadas com o nome de cada microrganismo, sendo dispostos de modo equidistante, semelhante ao recomendado para realização de antibiograma. No centro das placas foi colocado um disco esterilizado não embebido nos materiais experimentais. Deste modo, cada placa continha 3 discos, sendo 1 impregnado com formocresol, 1 impregnado com paramonoclorofenol canforado e 1 sem nenhuma solução (grupo controle).

As placas permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente, sendo transferidas para estufa bacteriológica permanecendo incubadas a 37° C por 48 horas.

Leitura dos Resultados

Após o período de incubação de 48 horas foi realizada a leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada disco. A medida corresponde à distância entre a borda do disco e a borda externa da faixa que se apresentava com aspecto liso e transparente evidenciando ausência de crescimento

bacteriano. A mensuração foi realizada com um paquímetro milimetrado. Utilizou-se duas medidas perpendiculares entre si, sendo obtida a média para cada disco.

Teste de Contra-Prova

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi coletado um pedaço da faixa de inibição de cada líquido testado, com auxílio de uma alça bacteriológica. O pedaço foi colocado em um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo BHI esterilizado e mantido em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas. Após este período foi verificada a presença ou ausência de turvação no caldo. A ausência de turvação do caldo confirmava a atividade antimicrobiana do material experimental sobre o microrganismo testado. Todo o experimento foi realizado em triplicata sob condições assépticas e conduzido pelo mesmo operador.

Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o software Statistical Package for Social Sciences 8.0, que calculou a mediana, os valores mínimos e máximos e a amplitude interquartilica (IQ) da variável tamanho do halo. Para verificar se houve diferença entre os materiais em relação ao tamanho do halo foi empregado o teste Mann-Whitney, em função da distribuição anormal desta variável.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as medidas dos halos de inibição de crescimento microbiano para os microrganismos *Pseudomonas*

Tabela 2 - Tamanho dos halos de inibição microbiana (mm) e comparação entre os materiais estudados.

Material	n	Tamanho do halo de inibição				Valor de p*
		Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude Interquartilica (IQ)	
<i>Formocresol</i>	12	11,0	16,0	12,7	11,6 - 15,0	< 0,001
<i>PMCC</i>	12	2,0	10,5	6,2	3,0 - 9,0	

aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Cândida albicans*. Observa-se que tanto o formocresol como o paramonoclorofenol canforado apresentaram halos de inibição em todas as placas e frente a todos os microrganismos testados. Também foi constatado que não houve inibição microbiana no grupo controle.

Com relação à contra-prova, observou-se turvação do caldo apenas na placa I do microrganismo *Bacillus subtilis*. No restante das placas verificou-se ausência de turvação.

A Tabela 2 demonstra que o formocresol apresentou halos de inibição entre 11 e 16mm, com mediana de 12,7mm (IQ = 11,6 – 15,0), enquanto que os halos de inibição do paramonoclorofenol canforado variaram entre 2,0 e 10,5mm, com mediana de 6,2mm (IQ = 3,0 - 9,0).

O teste de Mann-Whitney demonstrou que houve diferença significativa em relação ao tamanho do halo de inibição entre os materiais testados. O maior halo de inibição entre os materiais testados foi apresentado pelo formocresol que foi significativamente maior em relação ao paramonoclorofenol canforado ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Para a avaliação *in vitro* da capacidade antimicrobiana de substâncias odontológicas existem três técnicas que podem ser utilizadas: o método de diluição, o método de exposição direta e o teste de difusão em ágar. Cada uma das técnicas apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no momento de escolha da metodologia a ser empregada em uma pesquisa.⁷

O método de diluição é muito utilizado para determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima de um antimicrobiano, fornecendo a quantidade de agente antimicrobiano necessária. Por outro lado, o método de exposição direta fornece informações sobre a efetividade da substância e seu contato direto com o microrganismo, fornecendo informações qualitativas sobre as substâncias a serem testadas. Já a técnica de difusão em ágar constitui-se em um método simples, prático e eficiente para a avaliação da ação antimicrobiana, sendo por este motivo a

metodologia adotada nesta pesquisa. Este teste permite a observação de zonas de inibição de crescimento microbiano adjacentes aos discos que contêm o agente a ser testado. O diâmetro desta zona de inibição expressa a difusão do agente antimicrobiano, entretanto o tamanho da zona não necessariamente determina o poder antimicrobiano.

Deve-se considerar ainda que a atividade *in vitro* não se relaciona diretamente com a atividade *in vivo*.⁷ De acordo com Praetzel⁸ (2003), em um estudo *in vitro* não se pode simular perfeitamente uma situação *in vivo*, mas nele é possível controlar fatores que em um estudo *in vivo* não seriam possíveis.

A escolha dos microrganismos testados buscou abranger espécies usualmente utilizadas em estudos para avaliação de atividade antimicrobiana. A escolha do *Bacillus subtilis* deveu-se ao fato de que este microrganismo apresenta resistência aos processos de esterilização e desinfecção, servindo como parâmetro para a avaliação da eficiência do agente antimicrobiano testado. Os demais microrganismos foram selecionados por servirem de referência como controle de qualidade para procedimentos aplicados em testes de sensibilidade aos antimicrobianos e por serem comumente encontrados em canais radiculares infectados de dentes decíduos.⁸

Em recente estudo, Pazelli et al.⁹ (2003) concluíram que a infecção em canais radiculares de dentes decíduos necrosados e com lesão periapical é polimicrobiana. Esta afirmação também é corroborada por Praetzel⁸ (2003), que descreveu a presença de microrganismos anaeróbios estritos, facultativos, bacilos gram-negativos, gram-positivos e cocos gram-positivos no interior de canais radiculares infectados de dentes decíduos.

A ação antimicrobiana dos materiais foi evidenciada a partir da presença ou ausência de inibição do crescimento microbiano e, na contra-prova, pela ausência ou presença de turvação do meio. Tanto o formocresol como o paramonoclorofenol canforado apresentaram halos de inibição de crescimento microbiano frente a todos os microrganismos.

Na contra prova, com exceção da placa I do *Bacillus subtilis*, não houve turvação do caldo. Nesta placa, acredita-se que ocorreu um erro de

técnica com uma possível contaminação, possibilitando o crescimento bacteriano, resultando em turvação do caldo. Os inóculos das placas II e III não apresentaram turvação, portanto não houve crescimento bacteriano nas zonas de inibição das mesmas, o que permite que se afirme que o formocresol e o paramonoclorofenol canforado foram eficazes contra o *Bacillus subtilis*. Assim, os materiais testados apresentaram ação antimicrobiana frente aos microrganismos utilizados.

Com relação aos trabalhos que testaram a ação antimicrobiana do formocresol utilizando a técnica da difusão em ágar, os resultados encontrados na literatura estão de acordo com esta pesquisa.¹⁰⁻¹¹⁻¹² O mesmo pode-se constatar ao analisar os trabalhos que avaliaram a ação antimicrobiana do paramonoclorofenol canforado.²⁻¹²⁻¹³⁻¹⁴

Diferente da maioria dos trabalhos publicados na literatura, este estudo, além de avaliar a ação antimicrobiana, quantificou o tamanho do halo de inibição. Estrela et al.¹⁵ (2003) salientam que o tamanho do halo de inibição depende da solubilidade e difusibilidade do material testado, embora possa não expressar seu potencial efetivamente. Segundo Di Fiore et al.¹⁶ (1983), a difusibilidade de um material depende da sua estrutura química, do tamanho molecular e, também, das características do meio de cultura.

A maior difusibilidade do formocresol pode estar associada a sua ação à distância, através da liberação de gases. Por outro lado, o paramonoclorofenol canforado só atua por contato direto, não tendo ação à distância, o que poderia explicar sua menor difusibilidade.¹⁷

Assim, o fato de o formocresol apresentar maior difusão é um dado positivo. Porém, este é um estudo *in vitro* que possui limitações. Mais estudos são necessários para avaliar a capacidade de difusão dos materiais e quantificar até que ponto esta difusão é benéfica *in vivo*.

Com os resultados obtidos pela metodologia empregada, pode-se constatar a ação antimicrobiana do formocresol e do paramonoclorofenol canforado. Em síntese, o presente trabalho espera contribuir com uma avaliação criteriosa dos materiais freqüentemente utilizados como curativo de demora no tratamento endodôntico de dentes decíduos com canais infectados. Mais estudos

são necessários para avaliar o efeito da difusão destes materiais.

CONCLUSÃO

Baseados na metodologia aplicada e nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- Os materiais formocresol e paramonoclorofenol canforado apresentaram ação antimicrobiana.

- O formocresol apresentou halos de inibição significativamente maiores que o paramonoclorofenol canforado.

REFERÊNCIAS

1. Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1981; 35(3):240-5.
2. Siqueira Jr. JF, Lopes HP, Uzeda M. Atividade antibacteriana de medicamentos endodônticos sobre bactérias anaeróbias estritas. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1996; 50(4):326-31.
3. Corrêa Brusco EHC, Perussolo B, Scapin HLC, Ferreira SLM. Procedimentos e substâncias empregadas por Faculdades de Odontologia brasileiras na terapia endodôntica de dentes decíduos pulpectomizados. J Bras Odontopediatr Odontol Bebê. 2002; 5(23):35-46.
4. Rontani RMP, Possobon RF, Kassawara ABC. Estudo retrospectivo de pulpotomias realizadas com formocresol em dentes decíduos. J Bras Odontopediatr Odontol Bebê. 2000; 2(7):206-10.
5. Kramer PF, Faraco Jr. IM, Feldens CA. Estado atual da terapia pulpar nas Universidades Brasileiras: pulpotomia e pulpectomia em dentes decíduos. J Bras Odontopediatr Odontol Bebê. 2000; 3(13):222-30.
6. Batista A, Berger CR. Tratamento da polpa morta. In: Berger CR et al. Endodontia Clínica. São Paulo: Ed. Pancast; 2002. p.209-32.
7. Estrela C, Pimenta FC, Estrela CRA. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa odontológica. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em Odontologia. São Paulo: Ed. Artes Médicas; 2001. p.196-221.

8. Praetzel JR. Atividade antimicrobiana da Pasta Guedes-Pinto imediata e armazenada em condições diversas, por diferentes períodos de tempo [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2003.

9. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Medeiros AS, Nelson Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pediatr Dent.* 2003; 17(4):367-71.

10. Benfatti SV, Andrioni JN. Estudo in vitro de medicamentos utilizados em endodontia de decíduos. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1969; 23(6):213-8.

11. Bonow, MLM, Guedes-Pinto, AC, Bammann, LL. Antimicrobial activity of drugs used in pulp therapy of deciduous teeth. *Braz Endod J.* 1996; 1(1):44-8.

12. Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA. Inhibition of pure culture of oral bacteria by root canal filling materials. *Pediatr Dent.* 1996; 18(7):444-9.

13. Barbosa CAM, Gonçalves RB, Siqueira Jr. JF, UZEDA M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. *J Endod.* 1997; 23(5):297-300.

14. Silva CM, Candelária LFA, Bombana AC. Estudo comparativo da ação antimicrobiana entre cinco pastas de obturação de canais radiculares de dentes decíduos. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê.* 2002; 5(28):502-10.

15. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Souza-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 2003; 14(1):58-62.

16. DiFiore, PM, Peters DD, Setterstrom, JA, Lorton, L. The antimicrobial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. *Oral Surg.* 1983; 55:91-4.

17. Morais CAH, Bernardineli N, Garcia RB, Westphalen VPD. Paramonoclorofenol canforado e formocresol: empirismo x ciência. *J Bras Clin Estet Odontol.* 2001; 5(25):31-3.