

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE PASTAS À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

EVALUATION *IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PASTES BASED IN CALCIUM HYDROXIDE

Marcelo Junqueira PEREIRA¹

Mario Lucio Jardim PARREIRA²

Jorge Kleber CHAVASCO³

¹Mestre, Professor Titular de Odontopediatria da UNINCOR (Universidade Vale do Rio Verde), Três Corações – MG-Brasil

²Doutor, Professor Titular de Odontopediatria (Aposentado) da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte –MG-Brasil

³Doutor, Professor Associado de Microbiologia da UNIFAL-MG (Universidade Federal de Alfenas), Alfenas – MG-Brasil

Autor correspondente:

Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco
Universidade federal de Alfenas (UNIFAL-MG)
Rua Gabriel Monteiro da Silva 700
37130-000-Alfenas-MG-Brasil
Email: jkchavasco@uol.com.br

RESUMO: Neste trabalho avaliou-se a ação antimicrobiana “in vitro” de pastas à base de hidróxido de cálcio através do método de difusão em ágar. Amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* foram usadas nos experimentos. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela presença de halos de inibição do crescimento. Os resultados mostraram que os produtos avaliados apresentaram halos de inibição, exceto as pastas L & C, hidróxido de cálcio + óleo de girassol, hidróxido de cálcio + óleo de girassol + paramonoclorofenol canforado e óleo de girassol. Baseado no diâmetro dos halos, *Enterococcus faecalis* mostrou-se o mais resistente.

Palavras-chave: hidróxido de cálcio. dente decíduo. infecção endodôntica. paramonoclorofenol canforado. antimicrobiana.

ABSTRACT: The objective of this study was to verify “in vitro” antibacterial action of pastes based calcium hydroxide through method of agar diffusion. Agar plates were excavated and subsequently spread with microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*. After sowing, isolated pastes and components of same used as control substances were prepared and placed on excavations. Plates were taken to heater at 37°C for 24 hours. The existing of inhibition halos was analysed using millimeter ruler. The results showed that all of control pastes and substances introduced inhibition halos, except L&C pastes, calcium hydroxide + sun-flower oil, calcium hydroxide + sun-flower oil + paramonoclorophenol canphored, and sun-flower oil and physiologic serum.

Key words: calcium hydroxide. deciduous dentition. endodontic infection. paramonoclorophenol canphored. Antimicrobial.

INTRODUÇÃO

As preparações à base de hidróxido de cálcio são, há muito tempo, largamente utilizadas nos tratamentos de canais radiculares.

Com relação à indicação de materiais para obturação de canal radicular de dentes decíduos, podemos citar o hidróxido de cálcio pois Hunter, em 1883, relatou o uso de fezes de pardal inglês, que continha resíduos de hidróxido de cálcio, misturadas com melado para uso em capeamento pulpar. Porém, foi Hermann, em 1920, que relatou o primeiro material, propriamente dito, à base de hidróxido de cálcio. Hoje existem no comércio à disposição dos dentistas inúmeros produtos à base de hidróxido de cálcio (Aguiar *et al.*, 1996)¹.

O hidróxido de cálcio apresenta-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), com reconhecido poder antimicrobiano. Entre as características químicas, os veículos apresentam-se como hidrossolúveis (aquosos: soro fisiológico, água destilada, solução anestésica; viscosos : polietileno glicol, propileno glicol, metil celulose) e não hidrossolúveis ou oleosos: paramonoclorofenol canforado, óleo de oliva, etc (Estrela *et al.*, 1995)⁴.

Martins *et al.* (1979)⁸ relataram que em virtude do questionamento da eficácia ou não do hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbicas estes autores sugerem o acréscimo

do paramonoclorofenol canforado ao hidróxido de cálcio no intuito de melhorar a ação sobre estas bactérias.

Lage-Marques *et al.* (1992)⁶, declararam a eficácia do hidróxido de cálcio sobre o *Enterococcus faecalis*, assim como também para a *Pseudomonas aeruginosa*, porém, Safavi *et al.* (1990)¹¹, afirmaram que o hidróxido de cálcio é pouco efetivo sobre o *Enterococcus faecalis*.

Duarte *et al.* (1997)³, constataram que não houve inibição em nenhuma das espécies bacterianas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiela pneumoniae* e *Candida albicans*) quando do emprego da pasta hidróxido de cálcio com soro fisiológico.

Estrela *et al.* (1995)⁴ evidenciaram que a pasta, cujo veículo foi à solução fisiológica, demonstrou efetividade antimicrobiana sobre o *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* no tempo de 1 minuto; sobre o *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* após 48 horas e sobre o *Bacillus subtilis* após 72 horas. Enquanto que a pasta Calen com paramonoclorofenol canforado, após 1 minuto, exerceu efeito letal sobre o *Streptococcus mutans* e o *Enterococcus faecalis*, para o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e a *Candida albicans*, este efeito somente foi observado após 48 horas. De acordo com Oliveira *et al.* (1982)⁹, é necessário admitir

que, apesar de comprovadas as excelentes qualidades biológicas da pasta de hidróxido de cálcio, suas propriedades físicas não atendem a muitos requisitos necessários ou convenientes para seu emprego. Porém, sendo o hidróxido de cálcio uma substância de largo emprego com um percentual de sucesso bastante elevado, deve-se prosseguir nas pesquisas para que se possa obter o quanto antes um preparado comercial com todas as suas propriedades biológicas acrescidas de boas propriedades físicas, motivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODO

Os materiais obturadores analisados neste trabalho são de uso rotineiro para obturação de canal de dentes decíduos. A saber:

A- Pasta L & C :Com esta pasta, foram preparadas outras duas versões experimentais, acrescentando numa 0,15 ml paramonoclorofenol canforado e na outra 0,15 ml paramonoclorofenol.

B- Pasta Calen: Com esta pasta, foi preparada outra versão experimental, acrescentando 0,15 ml paramonoclorofenol.

C- Pasta Calen com paramonoclorofenol canforado

D- Hidróxido de Cálcio P.A. (Proben) 1g de pó + Soro fisiológico 1 ml: Com esta pasta, foram preparadas outras duas versões experimentais, acrescentando numa 0,15 ml

paramonoclorofenol canforado e na outra 0,15 ml paramonoclorofenol.

E- Hidróxido de Cálcio P.A. + Óleo de girassol comercial: Com esta pasta, foram preparadas outras duas versões experimentais, acrescentando numa 0,15 ml paramonoclorofenol canforado e na outra 0,15 ml paramonoclorofenol.

Além das pastas citadas acima, também foram avaliados como controle, os seguintes componentes destas pastas: óleo de girassol, soro fisiológico, paramonoclorofenol e paramonoclorofenol canforado.

O método de escolha para avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias em estudo foi o da difusão em agar de acordo com Bisterzo *et al* (2003)². A sensibilidade dos microrganismos foi detectada pela presença ou não dos halos de inibição, os quais foram medidos os diâmetros utilizando-se uma régua milimetrada.

A atividade antimicrobiana destas pastas e componentes foram testadas contra os seguintes microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans*, (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

Estes microrganismos foram escolhidos, por serem encontrados normalmente na cavidade bucal, podendo também serem encontrados nas infecções pulpares.

Com relação ao meio de cultura, utilizou-se o Agar BHI para *Candida albicans* e o Agar Mueller Hinton para as demais bactérias. O meio de cultura foi colocado em placa de Petri de 150mm x 20mm para obter uma espessura de 5 mm. Após a solidificação do meio, fez-se 16 poços de 4 mm de diâmetro em cada placa usando um tubo metálico estéril, para receber as 16 substâncias a serem testadas. Utilizou-se sete placas ou seja uma para cada microrganismo testado. Os microrganismos foram cultivados em Caldo BHI por 18 horas e, na hora do uso, a turvação foi ajustada até se obter uma turbidez visualmente comparada ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland com aproximadamente 150 milhões de microrganismos/mL. Essa diluição foi imediatamente semeada, com auxílio de “swab”, sobre o meio de cultura. Aguardou-se trinta minutos para secagem do inóculo.

Em seguida, os materiais foram manipulados em placas de vidro com espátulas de aço inoxidável, estéreis, no interior de capela fluxo laminar, seguindo-se as recomendações do fabricante ou até uma consistência pastosa. Foi estipulado um período de 1 minuto para a preparação de cada pasta. Após a manipulação, mediu-se o pH de cada substância e estas foram colocadas em dispositivos da seringa Centrix e pasta Calen em seringa endodôntica ML de aço inox rosqueável. Para as substâncias controles utilizou-se pipetas. Após completo preenchimento dos poços, aguardou-se um

período de 60 minutos para levar as placas à estufa a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a leitura, utilizando-se uma régua milimetrada, anotando-se o diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

De acordo com a Tabela 1, observamos que as pastas L & C, hidróxido de cálcio + óleo de girassol, hidróxido de cálcio + óleo de girassol + paramonoclorofenol canforado, e as substâncias óleo de girassol e soro fisiológico não apresentaram halos de inibição sobre nenhum dos microrganismos testados. A pasta L & C + paramonoclorofenol canforado apresentou um pequeno halo de inibição sobre o *Staphylococcus aureus* e o *Bacillus subtilis*. Quanto à pasta de hidróxido de cálcio + soro fisiológico esta mostrou pequeno halo de inibição sobre o *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*. As pastas Calen + paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio + óleo de girassol + paramonoclorofenol apresentaram halos sobre as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus subtilis*. A pasta Calen produziu pequenos halos sobre todas as bactérias. *C. albicans* mostrou-se resistente. A pasta de hidróxido de cálcio + soro fisiológico +

paramonoclorofenol , L & C + paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio + soro fisiológico + paramonoclorofenol canforado, Calen + paramonoclorofenol, e as substâncias paramonoclorofenol canforado, paramonoclorofenol produziram halos de inibição sobre todos os microrganismos

testados. A tabela 01 expressa as médias, em milímetros, dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, de três experimentos, obtidos com pastas à base de hidróxido de cálcio e substâncias controles, para os microrganismos em estudo.

TABELA 01 - Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana de substâncias obturadoras de canais radiculares de dentes decíduos, a base de hidróxido de cálcio, sobre os microrganismos mais comumente encontrados em condutos radiculares infectados.
(Valores médios de três experimentos, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento microbiano)

SUBSTÂNCIAS AVALIADAS	pH DAS SUBSTÂNCIAS AVALIADAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
01- Pasta L&C	10,0	0	0	0	0	0	0	0
02- Pasta L&C + Paramonoclorofenol	12,0	25,0	20,0	15,0	12,0	20,0	20,0	10,0
03- Pasta L&C + Paramonoclorofenol Canforado	9,0	0	0	0	10,0	0	8,0	0
04- Hidróxido de cálcio + Soro fisiológico	13,0	15,0	0	0	12,0	10,0	11,0	0
05- Hidróxido de cálcio + Soro fisiológico + Paramonoclorofenol	12,0	15,0	23,0	18,0	15,0	12,0	18,0	12,0
06- Hidróxido de cálcio + Soro fisiológico + Paramonoclorofenol Canforado	11,0	19,0	27,0	18,0	20,0	15,0	28,0	20,0
07- Hidróxido de cálcio + Óleo de Girassol	5,0	0	0	0	0	0	0	0
08- Hidróxido de cálcio + Óleo de Girassol + Paramonoclorofenol	6,0	15,0	12,0	18,0	15,0	15,0	12,0	0
09- Hidróxido de cálcio + Óleo de Girassol + Paramonoclorofenol Canforado	7,0	0	0	0	0	0	0	0
10- Pasta Calen	13,0	15,0	0	8,0	11,0	10,0	12,0	8,0
11- Pasta Calen + Paramonoclorofenol	6,0	35,0	35,0	24,0	25,0	20,0	28,0	22,0
12- Pasta Calen + Paramonoclorofenol Canforado	13,0	8,0	12,0	12,0	12,0	8,0	14,0	0
13- Óleo de Girassol	5,0	0	0	0	0	0	0	0
14- Soro fisiológico	6,0	0	0	0	0	0	0	0
15- Paramonoclorofenol	4,0	40,0	40,0	30,0	28,0	35,0	40,0	25,0
16- Paramonoclorofenol Canforado	5,0	30,0	28,0	20,0	20,0	20,0	25,0	18,0

DISCUSSÃO

A possibilidade de contaminação, ou mesmo a permanência de micro-organismos em canais radiculares já infectados durante a terapia, tem sido motivo para que inúmeros estudos sejam realizados na busca de uma medicação intracanal que seja eficaz em relação ao seu espectro antimicrobiano.

As preparações à base de hidróxido de cálcio são, há muito tempo, largamente utilizadas nos tratamentos de canais radiculares.

De acordo Aguiar *et al* (1996)¹, foi Hermann, em 1920, que relatou o primeiro material, propriamente dito, à base de hidróxido de cálcio. Hoje existem no comércio inúmeros produtos. No nosso trabalho foram avaliados vários produtos a base de hidróxido de cálcio associados ou não a outros produtos com ação antimicrobiana.

De acordo com a tabela 1, observamos não haver atividade antimicrobiana para a pasta L & C, para o Hidróxido de cálcio associado ao óleo de girassol, para o hidróxido de cálcio na associação de óleo de girassol e paramonoclorofenol canforado e para as substâncias veículos óleo de girassol e soro fisiológico, devido ao fato de não haver formado halo de inibição do crescimento microbiano. Provavelmente a adição de óleo de girassol neutraliza a atividade antimicrobiana dos produtos.

Na associação da pasta L & C com Paramonoclorofenol Canforado (PMCC),

observamos a presença de halos de inibição nos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, não tendo sido demonstrado ação antimicrobiana nos demais.

Em relação ao Paramonoclorofenol Canforado (PMCC), houve ação antimicrobiana em todos os microrganismos testados, dados, estes, encontrados por Martins *et al.* (1979)⁸, Analisando o Paramonoclorofenol (PMC), observamos que este apresentou os maiores halos de inibição sobre os microrganismos avaliados, demonstrando desta maneira seu alto grau de ação antimicrobiana, confirmando os achados de Estrela *et al.* (1995)⁴.

Estamos de acordo com Safavi *et al.*(1990)¹¹, quando mostraram que o hidróxido de cálcio não é efetivo sobre o *Enterococcus faecalis*, e em desacordo com os achados de Estrela *et al* (1995)⁴.

Segundo Estrela *et al.*⁴ (1995)⁴, Smith J.W. *et al.*(1984)¹³ e Lage-Marques *et al.* (1992)⁶, Estrela *et al.* (1995)⁴, o hidróxido de cálcio é eficaz sobre *Pseudomonas aeruginosa*, o que também foi, por nós, confirmado.

Os nossos achados mostraram que o hidróxido de cálcio não foi efetivo sobre *Echerichia coli*, o que contradiz os resultados encontrados por Estrela *et al.* (1995)⁴.

Comparando os nossos resultados da efetividade ou não do hidróxido de cálcio diluído em soro fisiológico com o de Duarte *et al.*(1997)³, observamos haver concordância da ação antimicrobiana para os

microrganismos *Enterococcus faecalis*, e *Candida albicans* e discordante para o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Estrela *et al.* (1995)⁴ relataram ser o hidróxido de cálcio diluído em soro fisiológico, efetivo contra o *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, afirmativa que confirmamos mas que se opõe em relação a *Candida albicans*.

Verificamos que, quando da associação do paramonoclorofenol a uma pasta de hidróxido de cálcio com soro fisiológico, houve efetividade de ação antimicrobiana para todos os microrganismos, bem como para a associação de canfora ao paramonoclorofenol pois os resultados da tabela 01 nos mostra que o hidróxido de cálcio somente , tem baixa atividade antimicrobiana.

Quando da formulação de uma pasta de hidróxido de cálcio, tendo como veículo o óleo de girassol associado ao paramonoclorofenol, observamos ação efetiva sobre todos os microrganismos avaliados, exceto para a o *Enterococcus faecalis*.

Com relação à Pasta Calen, os nossos achados estão concordantes com os de Leonardo *et al.*(1999)⁷ para as cepas microbianas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Estrela *et al.* (1995)⁴ citaram que, com relação à pasta Calen com Paramonoclorofenol canforado (PMCC), esta

foi efetiva para o *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, sendo que o nosso trabalho concorda com os resultados desses autores, exceto no que se refere ao *Enterococcus faecalis*.

Oliveira *et al.*(2010)¹⁰ utilizando Pasta Calen e Pasta Calen adicionada de paramonoclorofenol canforado verificou que as amostras de *C.albicans*, *B.subtilis* e *E.faecalis*, utilizadas nos experimentos, mostraram-se sensíveis a estes produtos, sendo estes resultados semelhantes aos nossos com exceção de *C. albicans* que se mostrou resistente a Pasta Calen.

Observamos que, quando associamos canfora ao paramonoclorofenol, esta substância apresentou menores halos de inibição quando comparadas entre si; provavelmente por ter aumentado o pH para 13, o que dificultaria a difusão da substância no meio.

Baseado no diâmetro dos halos de inibição , a bactéria que apresentou maior sensibilidade à ação das substâncias testadas foi *Bacillus subtilis*, enquanto que os de menor foi *E. faecalis*.

Analisando isoladamente as substâncias, a que mostrou melhores resultados antimicrobianos foi o paramonoclorofenol; e de acordo com as pastas, a de melhor eficácia foi a Calen quando associada ao Paramonoclorofenol.

Observamos, quando da associação do hidróxido de cálcio com veículo oleoso, que a sua difusão é mais lenta e conseqüentemente a sua ação antimicrobiana só seria realmente efetiva em função de um tempo maior de ação, de acordo com Fava *et al.* (1993)⁵, Estrela *et al.* (1995)⁴ e Siqueira Jr. *et al.* (1997)¹².

Com relação ao pH do hidróxido de cálcio, verificamos uma acentuada redução quando o mesmo foi diluído no óleo de girassol. As demais oscilações de pH desta substância em nosso experimento estão diretamente relacionada com a associação de mais de um veículo.

Sperança *et al.* (1989)¹⁴, Fava (1993)⁵, citam que a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio está diretamente relacionada com o pH altamente alcalino, o que em parte é corroborado com os nossos resultados.

Quando associamos o paramonoclorofenol na pasta que contém hidróxido de cálcio e óleo de girassol, verificamos que houve a neutralização do pH, o que se deve à cânfora, achado, este, semelhante aos encontrados por Soares *et al.* (1988)¹⁵ e Siqueira Jr. *et al.* (1997)¹².

CONCLUSÕES

1- As pastas formuladas à base de hidróxido de cálcio, que apresentaram maiores halos de inibição do crescimento microbiano foram as associadas ao paramonoclorofenol.

2- Os microrganismos mais sensíveis às substâncias testadas foram *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e o mais resistente foi *Enterococcus faecalis*

REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T.; Curativo de demora a base de hidróxido de cálcio. **RGO**, v. 44, n. 5, p. 292-298, set./out. 1996.
2. BISTERZO, J.C; PIRES, M.A.V.; CHAVASCO, J.K.; ROBAZZA, C.R.C.; FRANCO DE CARVALHO, E.M.O.; Avaliação de atividade antimicrobiana de medicamentos intracanal; **Rev.Assoc.Paul.Cir.Dent.** 57(5):373-6, 2003.
3. DUARTE, M. A. H.; WECKWERTH, P. H.; MORAES, I. G.; Análise da ação antimicrobiana de cimentos e pastas empregados na prática endodôntica. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 11, n. 4, p. 299-305, out./dez. 1997.
4. ESTRELA, C. *et al.*; Efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas. **Rev. FOB**, v. 3, n. 1/4, p. 109-114. jan./dez. 1995.
5. FAVA, L.R.G., ET AL, Efeito antibacteriano das pastas de hidróxido de cálcio – Revisão. **Rev. Paulista de Odont.**, v.15 nº 1 jan/fev. 1993.
6. LAGE-MARQUES, J. L. *et al.* ; Análise da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio P A sobre algumas espécies de microorganismos. Contribuição ao estudo. **Rev. Fac. Odontol. FZL**, v. 4, n. 2, p. 75-80, jul./dez. 1992.

7. LEONARDO, M. R. *et al.*; Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de pastas utilizadas em endodontia. **Revista APCD**, v. 53, n.5, p. 367-370, set./out. 1999.
8. MARTINS, J. B. *et al.*; Efeitos da biomecânica e de curativos de demora com hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol a 1% ou associação de ambos na redução da flora microbiana dos canais radiculares infectados, **ARS Cvrandy em Odontologia**, v. 6, n. 7, p. 44-57, 1979.
9. OLIVEIRA, W. G. B.; FONSECA, G. A. ; Hidróxido de cálcio substância heróica seu uso diversificado em endodontia. **Rev. Bras. Odont.**, v. 39, n.6, p. 21-46, nov./dez. 1982.
10. OLIVEIRA, E.P.M *et al.*;Avaliação da ação antimicrobiana de quatro formulações a base de hidróxido de cálcio utilizadas como medicação intracanal **RFO**, v. 15, n. 1, p. 35-39, janeiro/abril 2010.
11. SAFAVI, K. E. *et al.* ; Root canal dentinal tubule disinfection. **J. Endod.**, v. 16, p. 207-210, 1990.
12. SIQUEIRA JR *et al.* ; Atividade antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado/glicerina contendo diferentes proporções de iodofórmio sobre bactérias anaeróbias estritas e facultativas. **Revis. Paulista de Odont.**, v. 19, n. 2, p. 17-21, mar./abr. 1997.
13. SMITH, J. W.; LEEB, I. J.; TONEY, D. L.; A comparasion of calcium hydroxide and barium Hydroxide as agent for inducing apical closure. **J. End.**, v. 10, nº 2, p. 64-70, 1984.
14. SPERANÇA, P. A. *et al.* ; Atividade germicida do hidróxido de cálcio, **RGO**, v. 37, nº 5, p. 346- 348, 1989.
15. SOARES, M. S. *et al.* ;Medicação de uso tópico na odontologia. **Rev.Odontólogo Moderno**, v. 15, n. 5, p. 35-50, jun.1988.