

Atividade antimicrobiana de materiais reparadores de uso endodôntico pelos testes de difusão em ágar e por contato direto

Antimicrobial activity of repair materials of endodontic use by the agar diffusion test and the direct contact

Christiane Mazurek

Mestre em Endodontia pela Uerj

Luciana Moura Sassone

Doutora em Endodontia pela Uerj

Professora Adjunta de Endodontia da FO/Uerj

Aurimar de Oliveira Andrade

Cristiana Francescutti Murad

Doutorandos em Endodontia pela Uerj

Rivail Antônio Sérgio Fidel

Doutor em Endodontia pela FORP/USP

Professor Titular de Endodontia da FO/Uerj

Raphael Hirata Junior

Doutor em Microbiologia pela UFRJ

Professor Adjunto de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Uerj

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos materiais reparadores de uso endodôntico: MTA/Bio Angelus®, cimento Portland branco, MTA Angelus® branco e MTA ProRoot® branco sobre os micro-organismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, pelos testes de difusão em ágar e por contato direto. Os dados experimentais foram obtidos através da mensuração do halo de inibição formado e pela contagem de unidades formadoras de colônia, respectivamente. De posse dos resultados, foi possível verificar que o MTA/Bio Angelus® apresentou atividade antimicrobiana superior para todas as espécies bacterianas testadas tanto no teste de difusão em ágar quanto no teste por contato direto e que este último teste demonstrou ser uma metodologia segura, reproduzível e confiável.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; MTA; cimento Portland.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of repair materials of endodontic use MTA/Bio Angelus®, white Portland cement, white MTA Angelus® and white MTA ProRoot® on *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by the agar diffusion test and the direct contact test. Data was retrieved by measuring the zones of inhibition and by counting colony-forming units, respectively. The results showed that MTA/Bio Angelus® presented superior antimicrobial activity against all bacteria in the agar diffusion test and in the direct contact test. In addition, our results suggest that the use of the direct contact test is a safe, reproducible and trustable method.

Keywords: antimicrobial activity; MTA; cement Portland.

Introdução

As perfurações radiculares resultam na comunicação do sistema de canais radiculares com os tecidos periodontais e acontecem devido a processos de reabsorção, cáries, acidentes indesejáveis durante a terapia endodôntica ou na preparação de espaço protético para retentores intrarradiculares. Em estudo analítico relacionado à etiologia dos fracassos endodônticos, INGLE (6) registrou as perfurações radiculares iatrogênicas em segundo lugar de ocorrência. Os materiais utilizados com a finalidade de sanar tais situações devem apresentar características físico-químicas adequadas e com características biologicamente compatíveis, com vistas à estimulação da dentinogênese e osteogênese. Os materiais utilizados como reparadores de perfuração, assim como os retro-obturadores, têm grande influência no metabolismo dos tecidos perirradiculares, até porque ficam em contato direto com estes. Consequentemente, seria um fator positivo que esses materiais apresentassem atividade antimicrobiana, o que proporcionaria um ambiente mais propício à cicatrização e a utilização de substâncias com pH elevado, que além do efeito biológico, contribuiriam para alterar a estrutura e o metabolismo dos agentes envolvidos no processo infeccioso.

A partir dos estudos de LEE, MONSEF, TORABINEJAD (7), o agregado trióxido mineral (MTA ProRoot®) tem sido estudado com a finalidade de melhorar algumas propriedades que ainda deixam a desejar. Para tanto, surgiu o MTA ProRoot® branco, que veio permitir resultados mais favoráveis em tais regiões críticas. Paralelamente, a indústria nacional inseriu o MTA Angelus® no mercado e, recentemente, criou o MTA/Bio Angelus®, que ainda se encontra em fase de testes. Apesar das excelentes propriedades do MTA, as pesquisas prosseguem no sentido de melhorar algumas delas, especialmente a manipulação, inserção e diminuição do tempo de endurecimento. Apesar da gama de estudos em torno do MTA, existe um questionamento em relação a sua composição química que não era totalmente elucidada pelo fabricante, acrescida ao fato da sua semelhança com o cimento Portland (5). Por outro lado, o mecanismo de ação de tais cimentos é semelhante entre si, como também ao do hidróxido de cálcio, já conhecido no mercado por suas aplicações clínicas.

Partindo do princípio que a atividade antimicrobiana exercida pelo MTA contribuiria muito para o sucesso clínico, principalmente em regiões com maior prevalência de micro-organismos, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do MTA/Bio Angelus®, cimento Portland branco, MTA Angelus® branco e MTA ProRoot® branco após o endurecimento, sobre cepas ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*

e *Staphylococcus aureus* e comparar o teste de difusão em ágar com o teste por contato, quanto à determinação da atividade antimicrobiana.

Material e Método

Determinação da Quantidade de Material Utilizado para a Avaliação dos Testes de Atividade Antimicrobiana em Placas de Cultura de Células e de Difusão em Ágar

Com o objetivo de utilizar a mesma quantidade de material para cada amostra microbiana, foram confeccionados seis orifícios com um aro metálico de 5 mm de diâmetro, em uma lâmina de cera 7 (sete) sobre outra, obtendo a mesma espessura estabelecida. Neste molde, o gesso foi vertido para a obtenção de um modelo e sobre este modelo foram confeccionadas placas, aplicando-se a base leve do silicone Adsil® (Coltene/Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) pressionada com uma placa de vidro, até a presa deste material. As placas de silicone foram esterilizadas em autoclave Dabi Atlante (Ribeirão Preto, SP, Brasil), no ciclo de seis minutos. As três placas foram guardadas por 48 horas e embaladas até o momento da aplicação dos materiais no ensaio.

Manipulação dos Materiais

A manipulação do MTA ProRoot® branco, do MTA Angelus® e do MTA/Bio Angelus® foi realizada conforme as instruções do fabricante e logo após a manipulação, estes materiais foram depositados nos orifícios das placas de silicone. Desta forma, estas amostras foram padronizadas com 1 mm de altura e 5 mm de diâmetro. O experimento foi realizado imediatamente após o endurecimento dos materiais. O MTA ProRoot® branco, o MTA Angelus® e o MTA/Bio Angelus® são esterilizados previamente pelo fabricante e sua manipulação foi realizada no interior da câmara de fluxo laminar, objetivando manter a esterilidade. O cimento Portland foi manipulado e colocado dentro dos orifícios das placas de silicone e após seu endurecimento, os moldes em silicone contendo as pastilhas foram autoclavados, em temperatura de 121o C por 15 minutos.

Cepas Microbianas

As cepas utilizadas neste estudo foram obtidas da empresa *American Type Culture Collection*® (ATCC, Rockville, MD, EUA) e mantidas congeladas a -70o C em leite desnatado a 10% (SKIM milk, Difco® Laboratories, MI, EUA), contendo 5% de glicerol (Merck®, São Paulo, SP, Brasil). A seguir, as cepas selecionadas: *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923).

Condições de Cultivo e Padronização do Inóculo

As cepas microbianas foram ativadas, a partir de amos-

tras congeladas, e semeadas em placas de ágar soja triptícaseína. (TSB, Difco® laboratories, Detroit, MI, EUA) a 37°C/24h. Após o crescimento microbiano, as placas foram mantidas sob refrigeração (temperatura de aproximadamente 10° C) por um período de até 48 horas. Para a realização dos experimentos, os micro-organismos foram cultivados em meio líquido: caldo de soja triptícaseína (TSB, Difco®) a 37°C/24h. As culturas foram centrifugadas e lavadas três vezes com solução salina tamponada (PBS, 0,01M pH 7,2) e, ao término, ressuspensas na mesma solução. A suspensão microbiana foi ajustada por espectrofotometria (espectrofotômetro Micronal® B 295II) para absorvância (turvação) de 0,1 em comprimento de onda de 640 nm. A partir da suspensão original, foram procedidas diluições para a obtenção de valores correspondentes de 3 a 6 unidades formadoras de colônia por microlitro (UFC/μL) e utilizou-se 10 μL de suspensão bacteriana em cada poço a ser avaliado.

Teste de Difusão em Ágar

Os micro-organismos foram cultivados em Ágar Mueller-Hinton (Difco®) a 37oC/48h. Após o crescimento, os micro-organismos foram removidos da superfície das placas com auxílio de swabs estéreis e transferidos para tubos de ensaios contendo PBS. A suspensão foi calibrada para uma turvação similar ao tubo 0.5 da escala nefelométrica de McFarland e as placas foram preenchidas com Ágar Mueller-Hinton, que, após geleificação, foram semeadas na superfície do meio sólido com auxílio de swabs estéreis. Após a semeadura, as pastilhas, contendo o material a ser testado, foram colocadas no centro da placa, com auxílio de pinças estéreis. As placas foram incubadas a 37oC/24h, para posterior aferição dos diâmetros dos halos de inibição. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada espécie microbiana e a leitura dos halos de inibição foi realizada por dois avaliadores calibrados.

Teste por Contato Direto

O teste por contato direto foi adaptado de WEISS et al. (12). Este teste consiste na mensuração do crescimento cinemático microbiano pelo íntimo contato entre o micro-organismo testado e o material, utilizando-se microplacas de cultura de células de 96 poços. As pastilhas de cada um dos materiais foram dispensadas em uma microplaca de cultura de células de 96 poços e utilizou-se uma placa para cada micro-organismo, além de três poços para cada material. Realizou-se, ainda, o controle negativo (material com meio de cultura sem suspensão microbiana), onde foram utilizados dois poços e, além disso, dois poços para controle do crescimento microbiano (suspensão microbiana com meio de cultivo sem material). Os materiais foram colocados nos poços da microplaca com auxílio de uma pinça estéril e sobre o material, inoculou-se 10μl de cada suspensão microbiana utilizada no experimento (obtendo-se valores entre 30 e 60UFC/poço). Seguindo a inoculação, colocou-se sobre a mesma, 150μl de meio de cultura TSA (contendo 2% ágar).



Após a solidificação do meio de cultivo em cada poço da microplaca, esta foi incubada em uma estufa microbiológica a 37°C/24h. Transcorrido o período da incubação, os poços foram observados em um microscópio estereoscópio (Olympus, Metler®), para contagem das colônias.

Análise Estatística

Os resultados dos testes de difusão em ágar e por contato direto obtidos das 72 amostras analisadas, sendo três para cada material testado, foram analisados com auxílio do programa estatístico Primer of Statistics® (Primer, São Francisco, Califórnia, EUA). A análise dos diâmetros dos halos de inibição formados no teste de difusão em ágar e dos percentuais de redução de micro-organismos, em função do material testado no teste por contato direto, foi realizada por meio de análise de variância (one way Anova) e do teste t de Tukey. O nível de significância para todos os testes foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Resultados Obtidos pelo Teste de Difusão em Ágar

As amostras foram avaliadas 24 horas após a realização dos experimentos.

As médias dos halos de inibição formados, de acordo com o micro-organismo testado, se encontram descritas na Tabela I. Após a análise estatística dos resultados obtidos, foi possível verificar o desempenho dos materiais utilizados sobre os micro-organismos testados. Quanto ao *E. faecalis*, não houve diferença estatística significativa em relação aos materiais testados, considerando-se os diâmetros dos halos formados ($p = 0,054$). Em paralelo, quanto à cepa *E. coli* houve diferença estatística significativa em relação aos materiais testados ($p = 0,009$). Comparando os materiais entre si, verificou-se que o MTA Angelus® e o MTA/Bio Angelus® foram estatisticamente semelhantes e superiores aos demais materiais, sendo estes também semelhantes entre si. Ao mesmo tempo, os diâmetros dos halos formados, demonstraram diferença estatística significativa entre os materiais testados sobre o *S. aureus* ($p = 0,006$). Comparando-se os materiais entre si, verificou-se que o MTA ProRoot® branco, o MTA/Bio Angelus® e o cimento Portland apresentaram média de diâmetro do halo de inibição estatisticamente superior ao MTA Angelus® branco.

Resultados Obtidos pelo Teste por Contato Direto

Seguindo o mesmo protocolo do teste de difusão em ágar, as amostras foram avaliadas 24 horas após a realização dos experimentos. A atividade antimicrobiana do MTA ProRoot® branco, do MTA Angelus® branco, do MTA/Bio Angelus® e do cimento Portland por teste de contato foi mensurada pela observação de unidades formadoras de colônia em cada poço (UFC/poço). As médias das UFCs, de acordo com o micro-organismo testado, se encontram descritas na

Tabela II. A avaliação do desempenho dos materiais utilizados sobre as cepas de *E. faecalis* permitiu verificar diferença estatística significativa entre os materiais testados ($p = 0,00$). Ao comparar os materiais entre si, observou-se que o MTA/Bio Angelus® foi estatisticamente superior aos demais materiais testados e que o Cimento Portland foi superior ao MTA Angelus® ($p < 0,05$). À análise das cepas de *E. coli*, também foi observada diferença estatística significativa entre os materiais testados ($p = 0,00$). A comparação dos materiais entre si tornou evidente que o cimento Portland e MTA/Bio Angelus® tiveram comportamento semelhante entre si ($p > 0,05$) e superior ao MTA Angelus® e ao MTA ProRoot® branco ($p < 0,05$); sendo este último superior ao MTA Angelus® ($p < 0,05$). Ao avaliar as cepas de *S. aureus*, foi observado que houve diferença estatística significativa entre os materiais testados ($p = 0,027$). Ao comparar os materiais entre si, verificou-se que o MTA/Bio Angelus® foi superior na redução das UFCs que os demais materiais ($p < 0,05$). O MTA Angelus®, MTA ProRoot® branco e o cimento Portland apresentaram redução semelhante entre si ($p > 0,05$).

Discussão

A terapia endodôntica conta nos dias atuais com um índice de sucesso muito elevado, embora o profissional possa se deparar com desvios, calcificações, canais atrésicos, reabsorções e perfurações, pelos mais variados motivos. Por causa dessas intempéries, é necessário que se escolha um material adequado para solucionar possíveis acidentes. BATES, CARNES, DEL RIO (3), através do sistema de infiltração de fluidos, puderam comprovar a superioridade do MTA ProRoot® em relação ao amálgama e ao Super-EBA®. Enquanto que ADAMO *et al.* (1) destacaram a propriedade seladora do MTA ProRoot® em virtude de sua expansão em presença de umidade, convertendo-se em um gel coloidal que se cristaliza, expande e promove selamento marginal das cavidades.

Neste estudo, realizou-se inicialmente o teste de difusão em ágar, devido a este ser considerado padrão e de fácil execução. Alguns estudos já utilizaram esta consagrada metodologia, como o de TORABINEJAD *et al.* (11), que analisaram o MTA ProRoot®, verificando que o material não exerceu nenhuma atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*. ESTRELA *et al.* (5) verificaram que tanto o MTA ProRoot® quanto o cimento Portland, que também foi avaliado neste estudo, exibiram apenas zonas de difusão. Estes trabalhos apresentaram resultados semelhantes ao do presente estudo, onde se verificou que ambos os materiais não formaram halos de inibição sobre o *E. faecalis* e o *E. coli*, mas formaram estes quando a espécie testada foi o *S. aureus*. O MTA/Bio é um material ainda não disponível no mercado, cedido gentilmente pela empresa Angelus® e apresentou, neste estudo, resultados favoráveis de atividade antimicrobiana sobre todos os micro-organismos testados. A atividade antimicrobiana deste novo produto pode ser devido à presença de um plastificante adicionado ao líquido. Outro resultado favorável de associação foi observado por

STOWE *et al.* (10) que, associando a clorexidina 0,12% ao MTA ProRoot® branco, exibiu maiores halos de inibição do que quando o MTA foi associado à água estéril. Vale salientar que o estudo de STOWE *et al.* (10) contou com oito espécies microbianas e apenas a *P. aeruginosa* foi resistente à associação proposta. Ainda relatando sobre novos materiais, ZARRABI *et al.* (13) estudaram a atividade antimicrobiana do MTA, NEC (novo cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio, fosfato de cálcio e silicato de cálcio) e cimento Portland, sobre *E. faecalis*, *E. coli*, *Candida* e *Actinomyces*. Todos os cimentos não foram efetivos perante o crescimento do *E. faecalis* e a atividade antimicrobiana do cimento NEC foi superior com todos os micro-organismos testados, comparando-se ao MTA e cimento Portland.

Normalmente, os pesquisadores incluem *E. faecalis* e *Candida albicans* em seus estudos por estes serem refratários à terapia endodôntica. Deste modo, AL-HEZAMI *et al.* (2) testaram a atividade antimicrobiana de quatro preparações de MTA (2 MTA branco e 2 MTA cinza), sobre *C. albicans* e *E. faecalis*. O MTA branco (oriundo da Alemanha) necessitou de menores concentrações que o MTA branco (oriundo da França) para a eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis*. Em contrapartida, o MTA cinza da França, precisou de concentrações mais baixas que o MTA cinza da Alemanha para exercer atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis*. O trabalho de SIPERT *et al.* (9) não obteve halo de inibição com a utilização do MTA Angelus® e do cimento Portland sobre a *E. coli*, entretanto, obteve sobre o *E. faecalis*. O estudo de RIBEIRO *et al.* (8) demonstrou que o MTA Angelus®, o MTA ProRoot® e o cimento Portland inibiram o crescimento da *P. aeruginosa*. O presente estudo verificou que tanto o MTA Angelus® quanto o cimento Portland e o MTA ProRoot® não apresentaram formação de halos de inibição sobre o *E. faecalis*, que o cimento Portland e o MTA ProRoot® não formaram halo de inibição quando a espécie testada foi a *E. coli* e, também, que o MTA ProRoot® não formou halo de inibição sobre o *S. aureus*. Tais divergências poderão ser explicadas pelos diferentes tempos transcorridos entre a manipulação dos materiais e o teste *in situ*, já que nesses estudos citados, os materiais utilizados não se encontravam totalmente endurecidos. Deve-se destacar que em nosso estudo, o MTA/Bio Angelus® formou halo de inibição sobre todos os micro-organismos testados, apresentando os melhores resultados. Além disso, na literatura consultada, apenas um único artigo foi encontrado sobre a atividade antimicrobiana do MTA ProRoot®, utilizando-se o teste por contato direto. O trabalho de ELDENIZ *et al.* (4) apresentou resultados semelhantes ao do presente estudo, onde o MTA ProRoot® não apresentou atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis* e o *S. aureus* quando o material foi avaliado após um contato de três dias.

As conclusões obtidas por um estudo *in vitro* são limitadas, porque cada micro-organismo é testado isoladamente, o que difere de uma situação clínica, na qual vários micro-organismos estão associados e em um ambiente mais propício. Por outro lado, a atividade antimicrobiana não é o único fator que se deve levar em consideração ao se escolher um material reparador. Faz-se necessário um vasto conhecimento sobre todas as suas propriedades *in vitro*, para que esses materiais possam ser testados *in vivo* e, a partir daí, serem utilizados na clínica diária.

Tabela I. Diâmetros médios (em mm) dos halos de inibição dos materiais sobre o *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus* no teste de difusão em ágar

Espécimes / Materiais	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
MTA/Bio Angelus®	6,44 ± 1,26	8,55 ± 1,38	7,44 ± 0,76
Cimento Portland	5	5	6,82 ± 1,02
MTA Angelus®	5	8,99 ± 2,33	5
MTA ProRoot®	5	5	7,55 ± 0,50

Tabela II. Valores médios das unidades formadoras de colônia (UFC/poço) formadas sobre o *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus* no teste por contato direto

Espécimes / Materiais	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
MTA/Bio® Angelus®	5,33 ± 0,57	0,33 ± 0,57	0,66 ± 0,57
Cimento Portland	28,33 ± 8,08	1,33 ± 0,57	35 ± 23,90
MTA Angelus®	58 ± 7,55	41 ± 3,60	37,33 ± 7,02
MTA ProRoot®	43,67 ± 6,00	31,33 ± 1,52	32,67 ± 7,76

Conclusão

Após o endurecimento dos materiais a serem testados, observou-se que, tanto no teste por difusão em ágar quanto no teste por contato direto, o MTA/Bio Angelus® apresentou atividade antimicrobiana superior aos demais materiais testados sobre o *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus*.

Comparando-se as metodologias, o teste por contato direto demonstrou ser uma metodologia confiável e reproduzível, onde seus resultados não sofrem influência das propriedades físicas dos materiais quando em contato com o gel de ágar.

Referências Bibliográficas

1. ADAMO, H. L., BURUIANA, R., SCHERTZER, L. *et al.* A comparison of MTA, Super-EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial microleakage model. *International Endodontic Journal* 1999; 32: 197-203.
2. AL-HEZAIMI, K., THAKIB, A., AL-SHALAN, T. *et al.* MTA preparations from different origins may vary in their antimicrobial activity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2009; 107: 85-8.
3. BATES, C. F., CARNES, D. L., DELRIO, C. E. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *Journal of Endodontics*. 1996; 22 (11): 575-8.
4. ELDENIZ, A. U., HADIMI, H. H., ATOOGLU, H. *et al.* Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *Journal of Endodontics*. 2006; 32 (4): 345-9.
5. ESTRELA, C., BAMMANN, L. L., ESTRELA, C. R. A. *et al.* Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland Cement, Calcium Hydroxide Paste, Sealapex and Dycal. *Brazilian Dental Journal*. 2000; 11 (1): 3-9.
6. INGLE, J. I., BEVERIDGE, E. E. *Endodontia*. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1979; 40-2.
7. LEE, S. J., MONSEF, M., TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics*. 1993; 19 (11): 541-4.
8. RIBEIRO, C. S., KUTEKEN, F. A., HIRATA JUNIOR, R. *et al.* Comparative evaluation antimicrobial action of MTA, calcium hydroxide and Portland cement. *Journal of Applied Oral Science*. 2006; 14 (5): 330-3.
9. SIPERT, C. R., HUSSNE, R. P., NISHIYAMA, C. K. *et al.* In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral trioxide aggregate, Portland cement and Endorez. *Internacional Endodontic Journal*. 2005; 38: 539-43.
10. STOWE, T. J., SEDGLEY, C. M., STOWE, B. *et al.* The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*. 2004; 30 (6): 429-31.
11. TORABINEJAD, M., FORD, T. R. P., KETTERING, J. D. Antibacterial effects of some root end filling materials. *Journal of Endodontics*. 1995; 21 (8): 403-6.
12. WEISS, E., SHALHAV, M., FUSS, Z. Assessment of antibacterial activity of endodontics sealers by a direct contact test. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1996; 12: 179-84.
13. ZARABI, M. H., JAVIDI, M., NADERINNAB, M. *et al.* Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. *Journal of Oral Science*. 2009; 51 (3): 437-42.

Recebido em: 28/11/2011 / Aprovado em: 05/12/2011

Luciana Moura Sassone

Boulevard Vinte e Oito de Setembro, 157 – 2º andar - Vila Isabel

Rio de Janeiro/RJ, Brasil - CEP: 20551-030

Email: lsassone@uerj.br