




Julia BUOSI\*\*

 <https://orcid.org/0000-0003-2326-5047>


Karen Caroline Madri de SOUZA\*\*\*

 <https://orcid.org/0000-0002-0866-7120>

Gabriely Cristinni REZENDE\*\*\*\*

 <https://orcid.org/0000-0003-2203-4538>

Rogério de Castilho JACINTO\*\*\*\*\*

 <https://orcid.org/0000-0002-2362-8920>

Recebido em: 22 de abril de 2019

Aprovado em: 26 de novembro de 2020

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS VEÍCULOS UTILIZADOS NA PASTA DE  
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADA AO DICLOFENACO DE SÓDIO SOBRE  
*ENTEROCOCCUS FAECALIS*\*****THE INFLUENCE OF THE VEHICLES USED IN CALCIUM HYDROXIDE PASTE  
ASSOCIATED WITH DICLOFENAC SODIUM OVER *ENTEROCOCCUS FAECALIS*****RESUMO**

O hidróxido de cálcio é uma medicação intracanal amplamente utilizada durante o tratamento endodôntico, pois possui atividade antimicrobiana e estimula a produção de tecido mineralizado. Entretanto, alguns microrganismos, como o *Enterococcus faecalis*, podem sobreviver ao tratamento, resistindo ao elevado pH da pasta de hidróxido de cálcio. Por essa razão, associações com outras substâncias que apresentem atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* vem sendo sugerida. Recentemente, estudos têm demonstrado que a adição de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como o diclofenaco de sódio, tem conferido melhor eficácia à pasta de hidróxido de cálcio contra microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico. Porém, a propriedade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio está relacionada com a dissociação iônica, promovida pelo veículo utilizado durante sua manipulação. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar se a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada com o diclofenaco de sódio sofre influência quando manipulada com os diferentes veículos avaliados (clorhexidina 2%, soro e propilenoglicol). Para isso, as pastas foram, inicialmente, manipuladas de acordo com o veículo avaliado em cada grupo e, em seguida, 1mL de água estéril foi adicionado para cada 25mg da pasta e deixada a 37°C por 24h. Após esse período, 50µl de uma concentração conhecida de *Enterococcus faecalis* (10<sup>8</sup> UFC) foi adicionado em 1,4mL de cada solução e 1,4mL de solução salina 0,9% com a cepa foi usado como controle. Após 24 horas, as soluções foram então diluídas e inoculadas em placa petri contendo meio de *M-Enterococcus* em triplicada para a avaliação da atividade antimicrobiana de cada solução. Os resultados encontrados foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5% (p<0,05). Os resultados não evidenciaram diferenças estatísticas na atividade antimicrobiana para os diferentes veículos utilizados. Diante desses resultados, pode-se concluir que nenhum dos veículos avaliados influenciou na atividade antimicrobiana da medicação intracanal de hidróxido de cálcio.

**Descritores:** Hidróxido de Cálcio, Endodontia, *Enterococcus faecalis*.**ABSTRACT**

The calcium hydroxide is an intracanal medicament widely used during endodontic treatment, since it has antimicrobial activity, and stimulates the production of mineralized tissue. However, some microorganisms, such as *Enterococcus faecalis*, may survive treatment, resisting the high pH of the calcium hydroxide paste. For this reason, associations with other substances which perform antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* have been suggested. Recently, studies have shown that adding nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as diclofenac sodium, has guaranteed the effectiveness of the calcium hydroxide paste against resistant microorganisms for endodontic treatment. Although, the antimicrobial properties of calcium hydroxide paste with ionic dissociation, promoted by the vehicle used during manipulation. Accordingly, this paper aims to review if the antimicrobial activity of the calcium hydroxide paste associated with diclofenac sodium is influenced when manipulated with different vehicles evaluated (chlorhexidine 2%, saline solution, and propylene glycol). For this purpose, the pastes were, firstly, manipulated accordingly the vehicle evaluated in each group and, then, 1mL of sterile water was added to each 25mg of paste resting at 37°C for 24 hours. After this period, 50µl of a well-known concentrate of *Enterococcus faecalis* (10<sup>8</sup> UFC) was added to 1,4mL of each solution and, 1,4mL of saline solution 0,9% with a strain was used as control. After 24 hours, the solutions were then diluted and inoculated in a petri dish containing medium *M-Enterococcus* trebled to the evaluation of the antimicrobial activity of each solution. The results obtained were statically analyzed with a significance level of 5% (p<0,05). The results did not reveal statistical differences in the antimicrobial activity for different vehicles used. Based on these results, we can conclude that none of the vehicles evaluated influenced the antimicrobial activity of the calcium hydroxide intracanal medicament.

**Descriptors:** Calcium Hydroxide. Endodontics. *Enterococcus faecalis*.

\* Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Pibic/Unifunec

\*\* Graduanda em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, juliabuosi\_@outlook.com

\*\*\* Graduanda em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, karenmadri@hotmail.com

\*\*\*\* Doutora, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, gaby.cristinni@hotmail.com

\*\*\*\*\* Livre-Docência, docente da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/SP – FOA/UNESP, rogeriocastilho@foa.unesp.br

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O hidróxido de cálcio é uma medicação intracanal usada durante o tratamento endodôntico que apresenta atividade antimicrobiana e estimula a mineralização do tecido<sup>1</sup>, pois o alto pH do hidróxido de cálcio promove a inibição microbiana através de uma reação enzimática irreversível<sup>2</sup> e o cálcio atua limpando o dióxido de carbono usado para a respiração das bactérias anaeróbicas<sup>3</sup>. Além disso, o hidróxido de cálcio promove a inativação de lipopolissacarídeos bacterianos encontrados na membrana externa de bactérias gram negativas<sup>4</sup>.

Porém, alguns microrganismos, como o *Enterococcus faecalis*, podem apresentar resistência à medicação com hidróxido de cálcio<sup>5</sup>. Dessa forma, a associação de hidróxido de cálcio com outros agentes antimicrobianos foi proposta para melhorar a ação contra este microrganismo, têm evidenciado que a associação de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como o diclofenaco de sódio, à pasta de hidróxido de cálcio, aumentaram a eficácia da ação antimicrobiana no biofilme de *Enterococcus faecalis*<sup>6</sup>. O diclofenaco de sódio inibe a síntese de DNA bacteriano, apresentando assim ação bactericida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas<sup>7</sup>.

Entretanto, as propriedades biológicas das medicações com hidróxido de cálcio dependem da alcalinidade e liberação de íons cálcio, visto que é a dissociação de partículas de hidróxido de cálcio que permite a difusão de íons hidroxila e cálcio nas paredes do canal radicular, através dos túbulos dentinários<sup>8</sup>. Por essa razão, diferentes veículos vêm sendo propostos como aditivos para hidróxido de cálcio<sup>9</sup>, tais como solução salina, clorexidina e propilenoglicol<sup>10</sup>.

Os veículos podem ser classificados como aquosos, viscosos ou oleosos<sup>11</sup>, sendo que o veículo aquoso dissocia rapidamente o hidróxido de cálcio em íons de cálcio e hidroxila, promovendo maior solubilidade quando em contato com fluidos e sendo mais rapidamente reabsorvido por macrófagos<sup>8</sup>. Por outro lado, os veículos viscosos, como a glicerina e o propilenoglicol, apesar de serem solúveis em água, dissociam-se mais lentamente devido ao seu peso molecular. Já os veículos oleosos não são solúveis em água, e por isso promovem a menor solubilidade e difusão da pasta nos tecidos<sup>11</sup>.

A associação da pasta de hidróxido de cálcio com AINE tem evidenciado maior atividade antimicrobiana, entretanto a influência dos veículos utilizados na manipulação dessa associação ainda não foi estudada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da associação de diclofenaco sódico com a pasta de hidróxido de cálcio utilizando soro fisiológico, clorexidina

2% e propilenoglicol como veículo na ação antimicrobiana contra *E. faecalis*. A hipótese nula testada será que os veículos avaliados não interferem na atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada ao diclofenaco de sódio.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Seleção dos materiais

Para esse estudo, foram utilizados hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibitiporã, BR), Clorexidina 2% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibitiporã, BR), Propilenoglicol e Diclofenaco de Sódio.

### 2.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo HC: Hidróxido de Cálcio + Soro
- Grupo HCX: Hidróxido de Cálcio + Clorexidina 2%
- Grupo HP: Hidróxido de Cálcio + Propilenoglicol
- Grupo HCD: Hidróxido de Cálcio + Soro + Diclofenaco de Sódio
- Grupo HCXD: Hidróxido de Cálcio + Clorexidina 2% + Diclofenaco de Sódio
- Grupo HPD: Hidróxido de Cálcio + Propilenoglicol + Diclofenaco de Sódio
- Grupo C: Sem medicação

### 2.3 Preparo das medicações

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em um ambiente asséptico, dentro de uma câmara de fluxo laminar (Veco Flow Ltda., Campinas, SP, Brasil). A pasta de hidróxido de cálcio foi preparada com os veículos (1:1), pesada e, em seguida, será adicionado o diclofenaco de sódio na concentração 5% em peso. Uma quantidade de 250 mg de cada medicação intracanal foi pesada, manipulada e colocada em um tubo de falcon com 10 ml de água destilada para obter uma suspensão de medicação intracanal com uma concentração de 25 mg / ml. A suspensão será agitada e mantida em repouso durante 24 horas à temperatura ambiente<sup>12</sup>.

## 2.4 Teste de contato direto com bactérias planctônicas

Cepas padrão de *Enterococcus faecalis* foram inoculadas em meio de cultura BHI ágar (Brain Heart Infusion-HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, Índia) e deixadas em estufa a 37°C, por um período de 48 horas. Após esse período, uma fileira colônia de *Enterococcus faecalis* foi inoculada em 5 mL de meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion-HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, Índia) e mantida em estufa a 37°C por 12 horas para permitir o crescimento bacteriano. Após esse período, 50µl dessa cultura foi adicionado em 5 mL de meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion-HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, Índia) e a densidade óptica foi ajustada em cerca de 0,5 a 550 nm com um espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV/Vis – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão), para atingir uma concentração de bactérias de, aproximadamente, 10<sup>8</sup> CFU / mL<sup>13</sup>.

Com o inóculo preparado, 1,4 mL de cada solução de medicação foi colocada em tubos de polietileno de 2 mL e 50 µL da suspensão com concentração conhecida de *Enterococcus faecalis* foi adicionada.

Os tubos foram incubados a 37° C por 24 horas. As suspensões foram diluídas sequencialmente (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>) e 3 gotas de 10 µL das diluições pré-estabelecidas foram inoculadas pela técnica da semeadura por gotas, em triplicata, na superfície de placas de petri contendo o BHI para determinar a quantidade de *Enterococcus faecalis* viáveis<sup>13</sup>.

Quando as gotas secaram, as placas foram incubadas na estufa a 37° C, durante 24 horas, em aerobiose para a contagem das bactérias viáveis.

## 3.5 Análise estatística

Os dados encontrados foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5% (p<0,05) através do software Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA), usando single-factor ANOVA model e Kruskal-Wallis one-way test.

## 4 RESULTADOS

A Tabela 1. evidencia a mediana UFCmL<sup>-1</sup> dos diferentes grupos. A comparação entre os grupos revelou que o hidróxido de cálcio associado ao diclofenaco de sódio apresentou efetividade antimicrobiana, quando comparado com o grupo controle (p<0,001). Porém, não

houve diferença estatística entre os grupos de hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio associado ao diclofenaco de sódio. A comparação entre os veículos usados no preparo das pastas de hidróxido de cálcio associado ao diclofenaco não evidenciou diferença estatística na efetividade antimicrobiana da medicação.

**Tabela 1.** Mediana da UFC (UFC mL<sup>-1</sup>) das diferentes associações avaliadas.

<b>Grupos</b>	
<b>Hidróxido de Cálcio + soro</b>	0 <sup>A</sup>
<b>Hidróxido de Cálcio + clorexidina</b>	0 <sup>A</sup>
<b>Hidróxido de Cálcio + propilenoglicol</b>	0 <sup>A</sup>
<b>Hidróxido de Cálcio + soro+ Diclofenaco de sódio 5%</b>	0 <sup>A</sup>
<b>Hidróxido de Cálcio + clorexidina + Diclofenaco de sódio 5%</b>	0 <sup>A</sup>
<b>Hidróxido de Cálcio + propilenoglicol + Diclofenaco de sódio 5%</b>	0 <sup>A</sup>
<b>Controle</b>	6,5 x 10 <sup>7B</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,001).

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a influência dos veículos na atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associados ao diclofenaco de sódio contra *E. faecalis* foi avaliada. De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, não houve diferença estatística significativa na ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada ao diclofenaco de sódio independente do veículo avaliado. Portanto, aceitamos a hipótese nula de que não haveria diferenças significativas entre os veículos experimentais.

No presente estudo, o microrganismo de escolha foi o *E. faecalis*, devido a sua relação com a etiologia de infecções endodônticas persistentes e sua capacidade de sobreviver no canal radicular mesmo em ambientes desfavoráveis para a sua sobrevivência, como ausência de substrato e em pH alcalino<sup>14</sup>.

O hidróxido de cálcio é uma das medicações intracanaís mais utilizadas durante o tratamento endodôntico, por apresentar atividade antimicrobiana contra patógenos orais, como o *Enterococcus faecalis*<sup>1</sup>. No presente estudo, a pasta de hidróxido de cálcio foi capaz de eliminar o microrganismo presente, independentemente do veículo utilizado. Esses resultados estão de acordo com outros autores que também não encontraram diferenças estatísticas quando

a pasta de hidróxido de cálcio foi associada com soro fisiológico, clorexidina 1% e paramonoclorofenol canforado contra diversos patógenos orais, nos períodos de 1 minuto, 48 e 72 horas e 7 dias<sup>10</sup>.

A associação do hidróxido de cálcio com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como o diclofenaco de sódio, inibe a síntese de DNA bacteriano<sup>7</sup>, levando ao aumento na eficácia da ação antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*. Os resultados deste estudo não evidenciaram diferença estatística entre as pastas de hidróxido de cálcio associadas com diclofenaco de sódio e a pasta de hidróxido de cálcio, independentemente do veículo usado. Esses resultados discordam de outros resultados que avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio com 5% de diclofenaco de sódio sobre biofilme maduro de *E. faecalis*. Os diferentes resultados encontrados estão relacionados às diferentes metodologias empregadas para avaliar a efetividade antimicrobiana, pois, no presente estudo, os microrganismos foram utilizados com suspensão de *E. faecalis*, diferentemente de outros trabalhos que utilizou biofilme maduro do mesmo microrganismo<sup>6</sup>. Além disso, os estudos avaliaram diferentes tempos experimentais, o que pode ter influenciado na ação antimicrobiana das medicações avaliadas.

## 6 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos, é possível concluir que os diferentes veículos avaliados não foram capazes de alterar as propriedades antimicrobianas da pasta de hidróxido de cálcio associado ao diclofenaco de sódio.

## REFERÊNCIAS

- 1 Mizuno M., Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J.* [Internet] 2008; 41(11):933-938. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01420.x>
- 2 Siqueira Jr J.F., Lopes H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* [Internet] 1999;32(5):361-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x>
- 3 Kontakiotis E., Nakou M., Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J.* [Internet] 1995;28(6):285-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1995.tb00317.x>

- 4 Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* [Internet] 2003;36(11):733-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00717.x>
- 5 Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* [Internet] 2002;35(3):221-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x>
- 6 De Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, Cavenago BC, Vivan RR, Duarte MA, Weckwerth AC, Weckwerth PH. Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. *J Endod.* [Internet] 2017;43(1):131-134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.014>
- 7 Dutta NK, Annadurai S, Mazumdar K, Dastidar SG, Kristiansen JE, Molnar J, Martins M, Amaral L. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *Int J Antimicrob Agents.* [Internet] 2007;30(3):242-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.018>
- 8 Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod.* [Internet] 1998;24(1):15-7. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80205-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80205-7)
- 9 Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* [Internet] 2002;28(11):758-61. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200211000-00003>
- 10 Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J.* [Internet] 2001;34(5):341-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00368.x>
- 11 Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J.* [Internet] 1999;32(4):257-82. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00232.x>
- 12 Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M. Antimicrobial Activity and pH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine. *J Contemp Dent Pract.* [Internet] 2015;16(8):624-9. Disponível em: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1732>
- 13 Lodi CS, Turati LG, Freitas TT de, Colombo V, Rezende GC, Yamanari GH, Gomes-Filho JE. Avaliação in vitro da influência do protetor de superfície na adesão bacteriana a cimentos ionômero de vidro. *R. Funec Cient. Mult.* [Internet]. 2016;4(6):40-49. Disponível em: <https://seer.unifunec.edu.br/index.php/rfc/article/view/2160> DOI: <https://doi.org/10.24980/rfcm.v4i6.2160>
- 14 Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* [Internet] 2006;32(2):93-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>