

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO - UNISAGRADO

LARISSA BECKER FIORETTO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO NO pH,
LIBERAÇÃO DE CÁLCIO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE UMA PASTA DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

BAURU

2020

LARISSA BECKER FIORETTO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO NO pH,
LIBERAÇÃO DE CÁLCIO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE UMA PASTA DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em Odontologia -
Centro Universitário Sagrado Coração –
UNISAGRADO.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.

BAURU

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

F518i	<p data-bbox="506 1312 771 1344">Fioretto, Larissa Becker</p> <p data-bbox="506 1396 1307 1486">Influência da adição de microesferas de diclofenaco sódico no pH, liberação de cálcio e atividade antibiofilme de uma pasta de hidróxido de cálcio / Larissa Becker Fioretto. -- 2020.</p> <p data-bbox="552 1501 641 1533">26f. : il.</p> <p data-bbox="552 1585 1088 1617">Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.</p> <p data-bbox="506 1669 1307 1732">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p data-bbox="506 1774 1307 1837">1. Hidróxido de cálcio. 2. Microesferas. 3. Anti- inflamatórios. I. Silva, Guilherme Ferreira da. II. Título.</p>
-------	--

LARISSA BECKER FIORETTO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO NO pH,
LIBERAÇÃO DE CÁLCIO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE UMA PASTA DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em Odontologia -
Centro Universitário Sagrado Coração –
UNISAGRADO.

Aprovado em: 01/12/2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva (Orientador)
Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO

Prof.^a Dra. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira
Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO

Prof.^a Dra. Raquel Zanin Midena
Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO

Pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que meus pais, Ana Luiza e Luciano, me deram durante toda minha trajetória. Este trabalho é dedicado a eles.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado à oportunidade de estudar e ter a chance de realizar grandes conquistas em minha vida.

Deixo um agradecimento especial ao meu professor orientador Guilherme Ferreira da Silva pelo incentivo e dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa.

As professoras Danieli Colaço Ribeiro Siqueira e Raquel Zanin Midena, membros da banca examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo do seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho.

À todos os meus professores do curso de Odontologia do Centro Universitário Sagrado Coração, pela excelência da qualidade técnica de cada um.

À meus pais Ana Luiza e Luciano que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando durante toda essa caminhada.

Agradeço a meu namorado Fábio que acima de tudo é um grande amigo, sempre presente nos momentos difíceis com uma palavra de incentivo. Obrigada por estar em minha vida.

Aos meus irmãos Andrezza e Eduardo pela amizade e atenção dedicadas quando mais precisei.

À meu tio José Roberto, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência.

Também agradeço a minha amiga Lydia que sempre me ajudou e esteve ao meu lado em todos os momentos.

RESUMO

A medicação intracanal de escolha em casos de necrose pulpar é o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂]. Apesar de apresentar atividade antimicrobiana, existem bactérias que são resistentes à sua ação. Assim, há necessidade de estudar substâncias que possam ser adicionadas ao hidróxido de cálcio, como por exemplo, os anti-inflamatórios, para aumentar seus efeitos antimicrobianos e promover importante redução da concentração de microrganismo. Tem-se desenvolvido sistemas carreadores feitos a partir de polímeros que envolvem o fármaco, levando a liberação prolongada e em concentrações constantes desses agentes. O objetivo do presente estudo é avaliar o pH, liberação de íons cálcio e atividade antibiofilme de uma pasta de hidróxido de cálcio associada à microesferas carregadas com diclofenaco sódico. As microesferas foram preparadas a partir de um polímero e o diclofenaco sódico foi incorporado por agitação magnética. Feito isso, 5% destas microesferas foram misturados à pasta de hidróxido de cálcio. O teste do pH e da liberação dos íons cálcio foi realizado após 3 e 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. A avaliação antibiofilme foi analisada por microscopia confocal de varredura a LASER em blocos de dentina contaminados com *Enterococcus faecalis*. Ao final, todos os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Diante disso, podemos concluir que as pastas de hidróxido de cálcio com as microesferas de diclofenaco sódico apresentam propriedades físico-químicas semelhantes ao padrão utilizado e reduzem a atividade antibiofilme de forma significativa.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio. Microesferas. Anti-inflamatórios.

ABSTRACT

The intracanal medication of choice in cases of pulp necrosis is calcium hydroxide [Ca(OH)₂]. Despite having antimicrobial activity, there are bacteria that are resistant to its action, so it is important to study substances that can be added to calcium hydroxide, such as anti-inflammatory drugs, to increase their antimicrobial effects and promote important reduction of the microorganism concentration. Carrier systems made from polymers involving the use of drug have been developed, thus occurring prolonged release, keeping the concentrations of these agents constant. The aim of the present study is to evaluate the pH, release of calcium ions and antibiofilm activity of a calcium hydroxide paste associated with microspheres loaded with sodium diclofenac. The microspheres were prepared from a polymer and the sodium diclofenac were incorporated by magnetic stirring. That done, 5% of these microspheres were mixed with the calcium hydroxide paste. The pH and calcium ions release test were done after 3 and 24 hours, 7, 14, 21 and 28 days. The antibiofilm evaluation were analyzed by confocal LASER scanning microscopy on dentin blocks contaminated with *Enterococcus faecalis*. At the end, all data obtained were submitted to ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$). In view of this, we can conclude that the calcium hydroxide pastes with the microspheres of sodium diclofenac present physico-chemical properties similar to the standard used and significantly reduce antibiofilm activity.

Keywords: Calcium hydroxide. Microspheres. Anti-inflammatories.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Materiais e proporções utilizados nos diferentes grupos experimentais 14

Figura 1 - Microscopia confocal de varredura a LASER dos biofilmes tratados com os grupos experimentais..... 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias dos valores do pH para os diferentes materiais nos períodos avaliados	18
Tabela 2 - Médias da liberação de íons cálcio (mg/L) para os diferentes materiais nos períodos avaliados.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	10
2	OBJETIVO	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS	14
3.2	ANÁLISE DO pH E DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO.....	15
3.3	AVALIAÇÃO ANTIBIOFILME	15
3.3.1	Análise estatística	16
4	RESULTADOS	18
4.1	ANÁLISE DO pH E DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO.....	18
4.2	AVALIAÇÃO ANTIBIOFILME	19
5	DISCUSSÃO	20
6	CONCLUSÕES	22
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Quando a necrose pulpar se instala, todo o sistema de canais radiculares apresenta contaminação bacteriana e seus subprodutos. O sucesso do tratamento endodôntico depende do controle da infecção exercido pelo preparo químico-mecânico, isto é, instrumentação associada à utilização de substâncias irrigadoras. Além disso, é de fundamental importância a utilização de medicações intracanal para eliminar microrganismos remanescentes (BYSTROM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; HAAPASALO *et al.*, 2007).

O hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ é a substância de escolha para medicação intracanal, sendo o medicamento mais utilizado na endodontia. Caracteriza-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel e obtido pela calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio que, após hidratação, resulta em hidróxido de cálcio (ESTRELA *et al.*, 1995). Levando-se em consideração que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puro não tem consistência adequada para ser inserido no canal radicular, há a necessidade de associá-lo a um veículo, como por exemplo, o propilenoglicol, obtendo, assim, uma pasta passível de ser utilizada como medicação intracanal. Estas pastas são amplamente aceitas por apresentar vantagens em relação a outras substâncias, tais como, ação antimicrobiana e biocompatibilidade (ESTRELA *et al.*, 1995; FREITAS *et al.*, 2017; MIZUNO; BANZAI, 2008; SIQUEIRA; LOPES, 1999). Outra propriedade importante do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ é o efeito neutralizador de endotoxinas, pois altera algumas propriedades biológicas do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, como capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células de defesa, principalmente quando utilizado como medicação intracanal (SAFAVI; NICHOLS, 1993, 1994).

No decorrer dos anos, várias substâncias vem sendo estudadas e propostas para serem associadas às pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para melhorar algumas de suas propriedades, tais como, viscosidade, radiopacidade e dissociação iônica (BASRANI; GHANEM; TJÄDERHANE, 2004; ESTRELA *et al.*, 1995; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2012). É de conhecimento, também, que algumas bactérias, principalmente, o *Enterococcus faecalis*, são resistentes à ação das pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (MCHUGH *et al.*, 2004). Deste modo, é fundamental a incorporação de outros componentes à medicação de hidróxido de cálcio para aumentar sua atividade antimicrobiana.

Uma das alternativas é a associação de antibióticos ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Já foi comprovado que alguns antibióticos como, por exemplo, a amoxicilina são mais eficazes na redução bacteriana

quando comparados à pasta de Ca(OH)_2 (SABER; EL-HADY, 2012; SALEM-MILANI *et al.*, 2013). Além disso, a linezolida, um antibiótico sintético de amplo espectro, associada ao Ca(OH)_2 é eficaz na eliminação do *E. faecalis* (PAVASKAR *et al.*, 2012).

Além dos antibióticos, drogas anti-inflamatórias podem ser utilizadas para potencializar a ação antimicrobiana do Ca(OH)_2 , uma vez que, estudos revelaram que anti-inflamatórios não esteróides (AINES) possuem atividade antimicrobiana. Dastidar *et al.* (2000) evidenciaram que o diclofenaco sódico, um AINE, apresenta atividade antibacteriana, causando inibição da síntese do DNA de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estes resultados foram confirmados, posteriormente, por meio da verificação de que o diclofenaco de sódio apresenta atividade antimicrobiana e sua ação é potencializada quando associado à estreptomicina (DUTTA *et al.*, 2007).

Estudos já demonstraram, também, que o diclofenaco sódico e o ibuprofeno apresentam maior ação do que a pasta de Ca(OH)_2 contra *Enterococcus faecalis* (SALEM-MILANI *et al.*, 2013). Recentemente, foi observado que a associação de AINES ou antibióticos não interferiu no pH das pastas de hidróxido de cálcio e aumentou significativamente a atividade antimicrobiana contra a formação de biofilmes de *E. faecalis*, sendo que, os melhores resultados foram encontrados na mistura com diclofenaco sódico (FREITAS *et al.*, 2017). Ainda segundo os autores, a associação de AINEs ao Ca(OH)_2 apresenta a vantagem clínica de atuar no controle da inflamação, diminuindo a dor pós-operatória após o tratamento endodôntico.

Apesar dos resultados anteriores demonstrarem que a associação de AINE aumenta a atividade antimicrobiana das pastas de Ca(OH)_2 , estes estudos incorporaram drogas livres aos materiais. No entanto, são escassas as informações a respeito da influência em suas propriedades físicas e químicas e da atividade antibacteriana em períodos longos. Novas abordagens, especialmente na medicina, envolvem o uso de fármaco por meio de sistemas carreadores feitos a partir de polímeros, permitindo uma liberação prolongada, em concentrações constantes, destes agentes (PURI, K.; PURI, N., 2013). Os sistemas carreadores podem ter dimensões micro ou nanométricas, sendo esferas, constituídas basicamente por polímero, ou cápsulas, com uma parede polimérica ao redor de um núcleo que contém o fármaco (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Este sistema melhora a estabilidade da droga (OURIQUE *et al.*, 2008), sua biocompatibilidade e biodisponibilidade (GUINEBRETIERE *et al.*, 2002) e o controle da liberação da droga no organismo (HERNANDEZ *et al.*, 2013) o que está relacionado à redução

da dosagem e, portanto, à redução dos efeitos adversos (PURI, K.; PURI, N., 2013). Assim, a utilização destes sistemas associados aos materiais odontológicos podem ser uma alternativa na busca de ação terapêutica por um período prolongado. Porém, até onde pudemos constatar, são escassos na literatura os estudos dessas associações (DORNELLES JUNIOR *et al.*, 2018; GENARI *et al.*, 2017).

Para se desenvolver novas medicações intracanáis é fundamental o estudo das propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas do produto. Estas associações não devem interferir nas propriedades físicas e químicas da pasta de hidróxido de cálcio e os produtos e sub-produtos formados a partir da reação química não devem ser nocivos ao organismo. Sabe-se, por exemplo, que a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina ocasiona a formação da paracloroanilina e espécie reativa de oxigênio, substâncias classificadas com potencial carcinogênico (BARBIN *et al.*, 2013).

Portanto, torna-se fundamental uma pesquisa que avalie algumas propriedades da pasta de hidróxido de cálcio associada às microesferas de diclofenaco sódico que podem potencializar a atividade antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio pela liberação lenta e controlada da droga no organismo. Além disso, diferentemente dos antibióticos, a utilização de anti-inflamatórios não ocasiona a seleção de bactérias resistentes e pode modular a inflamação dos tecidos localmente, diminuindo a dor pós-operatória no paciente.

2 OBJETIVO

Investigar se a adição de microesferas carregadas com diclofenaco sódico interfere nas propriedades de uma pasta de hidróxido de cálcio. Para isso, foram verificados:

- a) o pH e a liberação de íons cálcio da pasta de hidróxido de cálcio associada à microesferas com diclofenaco sódico;
- b) a atividade antibiofilme desta pasta contra o *Enterococcus faecalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para atender nosso objetivo, foram verificados:

- a) o pH e a liberação de íons cálcio da pasta de hidróxido de cálcio associada à microesferas com diclofenaco sódico;
- b) a atividade antibiofilme desta pasta contra o *Enterococcus faecalis*.

Foram constituídos três grupos experimentais, de acordo com os materiais empregados, (Quadro 1).

Quadro 1 - Materiais e proporções utilizados nos diferentes grupos experimentais

Grupos experimentais	Materiais
Grupo 1 (HP)	Pó: Hidróxido de cálcio Veículo: propilenoglicol
Grupo 2 (HDP)	Pó: Hidróxido de cálcio + 5% de diclofenaco sódico Veículo: propilenoglicol
Grupo 3 (HMDP)	Pó: Hidróxido de cálcio + 5% de microesferas de diclofenaco sódico Veículo: propilenoglicol

Fonte: Elaborado pela autora.

3.1 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS

As microesferas foram preparadas a partir de um polímero (Eudragit® S100) e diclofenaco sódico. O polímero foi dissolvido em acetona e, posteriormente, o diclofenaco sódico foi incorporado por agitação magnética à 25°C, seguindo metodologia previamente descrita (DORNELLES JUNIOR *et al.*, 2018; GENARI *et al.*, 2017). A morfologia das microesferas carregadas com diclofenaco sódico foi caracterizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (JSM-TLLOA; JEOL, Takyo, Japão).

3.2 ANÁLISE DO pH E DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO

Para os testes do pH e da liberação de cálcio, 10 tubos de polietileno, medindo 1,5 mm de diâmetro interno, foram preenchidos com os diferentes materiais, imediatamente após a manipulação, colocados em frascos contendo 10 mL de água destilada e armazenados a 37° C. Após 3 horas, os tubos foram removidos e colocados em novos frascos e a água destilada foi trocada. Este procedimento foi repetido depois de cada período pré-determinado de 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. O pH das soluções foi analisado, em cada período, com o auxílio de um pHmetro digital previamente calibrado (Ultrabasic; Denver Instrument Company, Arvada, EUA). As mesmas soluções utilizadas para o teste do pH foram usadas no teste da liberação de íons cálcio. Nos mesmos períodos estabelecidos para o teste do pH, após os tubos terem sido transferidos para um novo frasco, a liberação de íons cálcio na água destilada foi mensurada utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica (H1170 Hilger & Watts; Rank Precision Industries Ltd. Analytical Division, London, UK). A concentração de íons cálcio liberada pelos materiais foi quantificada usando uma lâmpada de cátodo oco específica para comprimento de onda de 422,7 nm e janela de 0,7 nm, operada a 20 mA. As leituras de cálcio foram comparadas com uma curva padrão, obtida a partir de múltiplas diluições de cálcio P.A. em água ultrapura (SILVA *et al.*, 2014).

3.3 AVALIAÇÃO ANTIBIOFILME

Moldes de silicone obtidos por meio do corte de sonda gástrica nº 22 foram fixados em papel oleado, preenchidos com as pastas e submetidos à estufa bacteriológica com simulação de câmara úmida até os cimentos tomarem presa. Em seguida, os blocos foram lixados até se obter uma superfície plana e foram colocados em tubos tipo Eppendorf estéreis para serem submetidos à tinalização (100°C durante 1 hora por 3 vezes). Todos os procedimentos de preparo dos blocos de cimento foram realizados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

A indução do biofilme sobre os blocos de cimentos, *E. faecalis* ATCC 29212 foi realizada de acordo com metodologia recomendada por Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2013). Após confirmação da pureza da cepa, por coloração de Gram, morfologia de colônia, e identificação

bioquímica, o microrganismo foi reativado em 4 mL de caldo BHI estéril e mantido em estufa a 37°C, durante 12 horas.

Após este período, a densidade óptica do meio foi medida e ajustada em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm. Em placas de cultura celular de 24 poços (3 placas para cada grupo) foram colocados os blocos com as pastas com uma das superfícies marcadas com lápis e voltada para baixo. Em seguida, os blocos foram submersos com 3,6 mL de caldo BHI estéril adicionado de 0,4 mL do inóculo bacteriano padronizado. As placas foram colocadas em uma estufa bacteriológica a 37°C durante 21 dias. Para que não haja a deficiência de nutrientes para as células bacterianas, o meio de cultura BHI de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 horas, sem a adição de novos microrganismos.

Os espécimes foram colocados em placas de Petri e coradas com 50 µL da solução Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA), gotejada sobre o bloco de cimento. Após aplicação dos corantes, a placa foi fechada e envolta em papel laminado, para realizar a difusão dos corantes nos espécimes com ausência de luz e em temperatura de 37°C por 20 minutos, de acordo com as orientações do fabricante. Para o preparo do corante Live/Dead® BacLight foram adicionados 1,5 µL do componente A e 1,5 µL do componente B a 0,97 mL de solução salina a 0,85%. O marcador, que cora em verde as células viáveis, e em vermelho as células com danos na membrana, foi preparado imediatamente antes do seu uso, sendo o mesmo mantido em local protegido da luz e do calor durante todos os procedimentos.

Todos os espécimes foram examinados sob microscopia confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) em aumento de 40X. Três espécimes foram fotografados em cada grupo e foram tiradas 4 fotos por espécime, totalizando 12 fotos por grupo. As imagens foram analisadas pelo software bioImage_L para análise estrutural de biofilme formado sobre os blocos de cimento, segundo Chávez de Paz (2009).

3.3.1 Análise estatística

Os resultados quantitativos obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Aos dados foi aplicado o teste

estatístico paramétrico ANOVA para comparação dos diferentes grupos entre si, dentro de cada período experimental, para posteriormente, quando observada diferença significativa em nível de 5%, realizar a comparação entre os materiais, dois a dois, pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4 RESULTADOS

As seções a seguir apresentam os resultados da pesquisa.

4.1 ANÁLISE DO pH E DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO

A água destilada dos frascos contendo os materiais avaliados apresentou pH alcalino nos diferentes períodos. Em relação à liberação de íons cálcio, todos os materiais foram capazes de liberar cálcio nos períodos avaliados. Para ambos os testes, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os diferentes grupos experimentais (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Médias dos valores do pH para os diferentes materiais nos períodos avaliados

	GHP	GHDP	GHMD
24 h	10,34	10,32	10,32
7d	10,22	10,09	10,07
14 d	10,06	10,09	10,05
21 d	10,19	10,08	10,07
28 d	10,09	10,09	10,07

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: GHP: grupo hidróxido de cálcio e propilenoglicol; GHDP: grupo Hidróxido de cálcio + 5% de diclofenaco sódico e propilenoglicol; GHMDP: grupo Hidróxido de cálcio + 5% de microesferas de diclofenaco sódico e propilenoglicol

Nota: Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes para os diferentes materiais ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 - Médias da liberação de íons cálcio (mg/L) para os diferentes materiais nos períodos avaliados

	GHP	GHDP	GHMD
24 h	12,54	11,87	12,56
7d	11,84	11,53	12,56
14 d	11,64	11,33	11,66
21 d	11,53	10,68	11,79
28 d	11,43	10,18	11,79

Fonte: Elaborada pela autora.

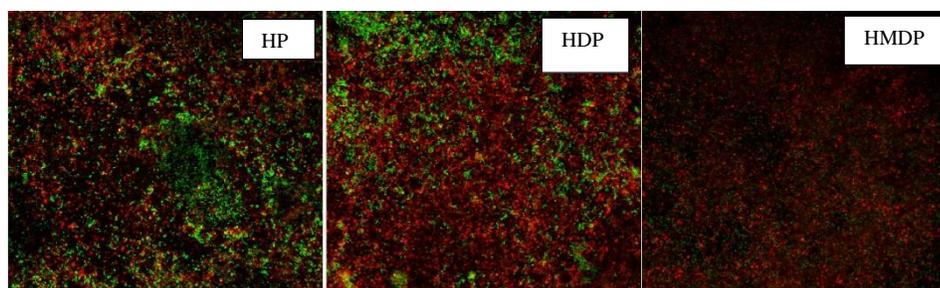
Legenda: GHP: grupo hidróxido de cálcio e propilenoglicol; GHDP: grupo Hidróxido de cálcio + 5% de diclofenaco sódico e propilenoglicol; GHMDP: grupo Hidróxido de cálcio + 5% de microesferas de diclofenaco sódico e propilenoglicol.

Nota: Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes para os diferentes materiais ($p \leq 0,05$).

4.2 AVALIAÇÃO ANTIBIOFILME

A análise da atividade antibiofilme evidenciou que todas as pastas de hidróxido de cálcio reduziram a quantidade de *Enterococcus faecalis*. No entanto, a pasta contendo as microesferas (HMDP) promoveu maior efetividade na redução bacteriana em comparação aos demais grupos (Figura 1).

Figura 1 - Microscopia confocal de varredura a LASER dos biofilmes tratados com os grupos experimentais



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Células vivas estão representadas em verde, enquanto, células mortas são vistas em vermelho. GHP: grupo hidróxido de cálcio e propilenoglicol; GHDP: grupo Hidróxido de cálcio + 5% de diclofenaco sódico e propilenoglicol; GHMDP: grupo Hidróxido de cálcio + 5% de microesferas de diclofenaco sódico e propilenoglicol.

5 DISCUSSÃO

Uma das etapas fundamentais durante o tratamento de dentes com necrose pulpar é o controle de infecção endodôntica. Após o preparo biomecânico é utilizada medicação intracanal (hidróxido de cálcio) que auxilia no processo de desinfecção. No entanto, sabe-se que alguns microrganismos são resistentes a este tipo de curativo. Deste modo, vários tipos de substâncias vêm sendo sugeridas para serem adicionadas às pastas de hidróxido de cálcio para aumentar o espectro antimicrobiano. Já foi evidenciado que o diclofenaco sódico associado ao hidróxido de cálcio aumenta significativamente a atividade antibiofilme contra o *Enterococcus faecalis*.

Atualmente, sistemas carreadores vêm sendo utilizados para proporcionar a liberação lenta e controlada de diferentes fármacos no organismo. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo a estudar algumas propriedades da pasta de hidróxido de cálcio associada à microesferas de diclofenaco sódico, objetivando a liberação controlada deste AINE no local desejado, o que pode potencializar seu efeito antimicrobiano.

Nossos resultados mostraram que a adição de microesferas de diclofenaco sódico não interferiu nas propriedades físico-químicas da pasta de hidróxido de cálcio, uma vez que, todos os grupos induziram um pH alcalino e não foram observadas diferenças significantes nos valores para liberação de íons cálcio. Estes achados estão de acordo com de Freitas *et al.* (2017). As pastas de Ca(OH)_2 , utilizadas como medicações intracanaís, ficam em contato direto com os tecidos apicais e periapicais e, por apresentarem pH alcalino e liberação de íons cálcio, auxiliam no processo de reparo destes tecidos (SILVA *et al.*, 2017).

Segundo Sundqvist *et al.* (1998) e Roças, Siqueira e Santos (2004) o *Enterococcus faecalis* é um dos microrganismos mais resistentes ao tratamento endodôntico, podendo sobreviver no interior do sistema de canais radiculares e desencadear o insucesso da terapia. Deste modo, estratégias de eliminação desta bactéria devem ser constantemente estudadas. Já foi demonstrado que a pasta de hidróxido de cálcio associada ao diclofenaco sódico aumentou significativamente a atividade antimicrobiana contra a formação de biofilmes de *E. faecalis* (FREITAS *et al.*, 2017). No presente estudo, foi observado que a atividade antibiofilme da pasta de hidróxido de cálcio contendo as microesferas de diclofenaco sódico promoveram maior efetividade na redução bacteriana em comparação aos demais grupos. Estes resultados podem

estar relacionados à ação terapêutica por período prolongado promovido pelo sistema de carregadores em microesferas (DORNELLES JUNIOR *et al.*, 2018; GENARI *et al.*, 2017).

Estudos anteriores já demonstraram que a pasta de hidróxido de cálcio associada ao diclofenaco sódico apresentou atividade antibiofilme contra *E. faecalis* (FREITAS *et al.*, 2017) e induziu reação inflamatória menos intensa do que a pasta de Ca(OH)_2 pura (SILVA *et al.*, 2017). No entanto, a presente pesquisa é a primeira a analisar o pH, liberação de íons cálcio e a atividade antibiofilme desta mistura contendo microesferas de diclofenaco de sódio. Apesar dos resultados encontrados serem promissores, há necessidade da análise de outras propriedades para indicação de seu uso na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, podemos concluir que a pasta de hidróxido de cálcio com as microesferas de diclofenaco sódico apresenta propriedades físico-químicas semelhantes ao padrão utilizado e reduziu a atividade antibiofilme de forma significativa.

REFERÊNCIAS

- BASRANI, B.; GHANEM, A.; TJÄDERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J Endod**, New York, v. 30, n. 6, p. 413-417, June 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15167469/>. Acesso em: 15 maio 2020.
- BARBIN, L. E. *et al.* Detection of para-chloroaniline, reactive oxygen species, and 1-chloro-4-nitrobenzene in high concentrations of chlorhexidine and in a mixture of chlorhexidine and calcium hydroxide. **J Endod**, New York, v. 39, n. 5, p. 664-668, May 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23611387/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 1, n. 5, p. 170-175, Oct. 1985. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-9657.1985.tb00652.x>. Acesso em: 15 maio 2020.
- CHÁVEZ DE PAZ, L. E. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 75, n. 6, p. 1734-1739, Mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19139239/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- DASTIDAR, S. G. *et al.* The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 249-251, Apr. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10773497/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- FREITAS, R. P. *et al.* Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. **J Endod**, New York, v. 43, n. 1, p. 131-134, Jan. 2017. Disponível em: [https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(16\)30618-5/pdf](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(16)30618-5/pdf).
- DORNELLES JUNIOR, N. B. *et al.* Influence of the addition of microsphere load amoxicillin in the physical, chemical and biological properties of an experimental endodontic sealer. **J Dent**, Kidlington, v. 68, p. 28-33, Jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29107135/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- DUTTA, N. K. *et al.* Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 242-249, Sep. 2007. Epub 2007 Jul 17. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644318/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- ESTRELA, C. *et al.* Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995. Disponível em: <https://www.forp.usp.br/bdj/t0262.html>. Acesso em: 10 jun. 2020.

FREITAS, R. P. *et al.* Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. **J Endod** New York, v. 43, n. 1, p. 131-134, Jan. 2017. Disponível em: [https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(16\)30618-5/fulltext](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(16)30618-5/fulltext). Acesso em: 10 jun. 2020.

GENARI, B. *et al.* Effect of indomethacin-loaded nanocapsules incorporation in a dentin adhesive resin. **Clin Oral Investig**, Berlin, v. 21, n. 1, p. 437-446, Jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27068412/>. Acesso em: 22 set. 2020.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. *et al.* Comparative analysis of Enterococcus faecalis biofilm formation on different substrates. **J Endod**, New York, v. 39, n. 3, p. 346-350, Mar. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23402505/>. Acesso em: 22 set. 2020.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. *et al.* Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. **Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 28, n. 4, p. 320-323, Aug. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-9657.2011.01112.x>. Acesso em: 14 jun. 2020.

GUINEBRETIERE, S. *et al.* Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, Amsterdam, v. 21, n. 1-2, p. 137-142, Sept. 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493102000735>. Acesso em: 22 set. 2020.

HAAPASALO, M. *et al.* Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **J Endod**, New York, v. 33, n. 8, p. 917-925, Aug. 2007. Disponível em: [https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(07\)00387-1/fulltext](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(07)00387-1/fulltext). Acesso em: 15 maio 2020.

HERNANDEZ, F. J. *et al.* Targeting cancer cells with controlled release nanocapsules based on a single aptamer. **Chem Commun (Camb)**, Cambridge, v. 49, n. 13, p. 1285-1287, 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cc/c2cc37370j#!divAbstract>. Acesso em: 22 set. 2020.

MCHUGH, C. P. *et al.* pH required to kill Enterococcus faecalis in vitro. **J Endod**, New York, v. 30, n. 4, p. 218-219, Apr. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15085049/>. Acesso em: 22 set. 2020.

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**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 933-938, Nov. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19133082/>. Acesso em: 14 mar. 2020.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, June 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15167469/>. Acesso em: 22 set. 2020.

- OURIQUE, A. F. *et al.* Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 352, n. 1-2, p. 1-4, Mar. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18249513/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- PAVASKAR, R. *et al.* An in vitro study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide– and linezolid-based medicaments against enterococcus faecalis. **J Endod**, New York, v. 38, n. 1, p. 95-100, Jan. 2012. Epub 2011 Nov 13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22152629/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- PURI, K.; PURI, N. Local drug delivery agents as adjuncts to endodontic and periodontal therapy. **J Med Life**, Bucharest, v. 6, n. 4, p. 414–419, Dec. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4034307/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, New York, v. 30, n. 5, p. 315-320, May 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15107642/>. Acesso em: 15 out. 2020.
- SABER, S. E. D. M.; EL-HADY, S. A. Development of an intracanal mature Enterococcus faecalis biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. **Eur J Dent**, Ankara, v. 6, n. 1, p. 43-50, Jan. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3252799/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, New York, v. 19, n. 2, p. 76-78, Feb. 1993. Disponível em: [https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(06\)81199-4/pdf](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(06)81199-4/pdf). Acesso em: 15 maio 2020.
- SAFAVI, K. E.; NICHOLS F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J Endod**, New York, v. 20, n. 3, p. 127-129, Mar. 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7996084/>. Acesso em: 11 jun. 2020.
- SALEM-MILANI, A. *et al.* Antibacterial effect of diclofenac sodium on enterococcus faecalis. **J Dent (Tehran)**, [Tehran, Iran], v. 10, n. 1, p. 16-22, Jan. 2013. Epub 2013 Jan 31. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3666061/pdf/jod-10-16.pdf>. Acesso em: 22 set. 2020.
- SILVA, G. F. *et al.* Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v. 102, n. 12, p. 4336-4345, Dec. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24497271/>. Acesso em: 22 set. 2020.
- SILVA, G. F. *et al.* Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. **Int Endod J**, Oxford, v. 50, Suppl 2, p. e95-e108, Dec. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28470859/>. Acesso em: 22 set. 2020.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 361-369, Sept. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10551109/>. Acesso em: 7 jun. 2020.

SUNDQVIST, G. *et al.* Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** St. Louis, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9474621/>. Acesso em: 15 out. 2020.