

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MARIA ANTONIA INETE QUAGGIO

INFLUÊNCIA NA BIOCOMPATIBILIDADE DE UMA PASTA DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO ACRESCIDA DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO

BAURU

2019

MARIA ANTONIA INETE QUAGGIO

INFLUÊNCIA NA BIOCOMPATIBILIDADE DE UMA PASTA DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO ACRESCIDA DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Odontologia - Universidade do Sagrado
Coração.

Orientador: Prof.^a Dr. Guilherme Ferreira
da Silva.

BAURU

2019

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

Q1i	<p>Quaggio, Maria Antonia Inete</p> <p>Influência na biocompatibilidade de uma pasta de hidróxido de cálcio acrescida de microesferas de diclofenaco sódico / Maria Antonia Inete Quaggio. -- 2019. 24f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Microesferas. 2. Anti-inflamatório. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Biocompatibilidade. I. Silva, Guilherme Ferreira da.</p>
-----	---

Elaborado por Lidiane Silva Lima - CRB-8/9602

MARIA ANTONIA INETE QUAGGIO

INFLUÊNCIA NA BIOCOMPATIBILIDADE DE UMA PASTA DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO ACRESCIDA DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO SÓDICO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Odontologia - Universidade do Sagrado
Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr. Guilherme Ferreira da Silva (Orientador)
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Murilo Priori Alcalde
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Raquel Zanin Midena Mesquita
Universidade do Sagrado Coração

Dedico este trabalho aos meus pais, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que eu pudesse realizar este sonho que tenho desde que me conheço por gente, além de ter me mantido forte e resiliente apesar de todas as dificuldades encontradas.

A minha mãe, agradeço por todo apoio, conselhos em momentos difíceis e por ser minha inspiração para que eu me torne uma pessoa forte e gentil, independente da situação; a meu pai, agradeço por nunca ter deixado nos faltar nada, por ter me dado a melhor educação e por permitir que eu fizesse o curso que sempre sonhei; a meu irmão, por ser a pessoa calma da casa e por sempre nos fazer rir.

Agradeço a meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva, que sempre esteve disponível para me auxiliar em clínicas e apresentações de trabalhos, por ser sempre tão paciente comigo e com meu pai e por me ensinar mais sobre a especialidade que mais amo.

A meu irmão no Santo e na Umbanda, agradeço ao Atilio, que é filho de Oxóssi, por inspirar e incentivar a filha de Nanã que vos escreve a levar a vida de uma maneira mais leve e tranquila, sem tanta seriedade e cobranças.

Para as minhas duplas da faculdade, agradeço por todo o companheirismo durante os semestres, mas também peço perdão pelos momentos em que fui exigente e perfeccionista ao extremo.

A cada pessoa que esteve ao meu lado durante a graduação, obrigada por terem contribuído com a minha formação – levo comigo um pouquinho de cada um.

“São as chamas de verdade e da justiça de Xangô que vestem meu corpo e protegem meu espírito” - Autor Desconhecido.

RESUMO

Embora seja um material amplamente usado na Endodontia, a pasta de hidróxido de cálcio não possui amplo espectro de ação antimicrobiana, fator que pode levar ao insucesso do tratamento endodôntico, devido a permanência do processo infeccioso. Sendo assim, torna-se necessário o estudo da associação dessa pasta a fármacos, como anti-inflamatórios, com o propósito de aumentar a atividade antimicrobiana deste curativo. Então, o objetivo deste projeto foi avaliar a influência, ação que microesferas de diclofenaco de sódio causarão em uma pasta de hidróxido de cálcio. Partindo da proporção de 1g de pó de hidróxido de cálcio para 1mL de propilenoglicol, 5% de microesferas foi misturado a pasta e, usando análise morfológica e morfométrica, foi feita avaliação do tecido adjacente aos implantes - com os medicamentos - no subcutâneo de ratos. As pastas de foram manipuladas de acordo com o material de teste e posteriormente inseridas em tubos de polietileno, além do uso de tubos vazios como controle; e os animais foram avaliados por períodos de 7 e 30 dias. Decorridos esses períodos, os tecidos adjacentes aos implantes foram coletados, processados histologicamente e corados em HE para caracterização do processo inflamatório no local. No período de 7 dias, visualizou-se processo inflamatório intenso em todos os grupos experimentais, com a presença de neutrófilos. Já em 30 dias, houve regressão do processo inflamatório instalado em todos os grupos. Embora não se tenham observado diferenças na adição de microesferas de diclofenaco de sódio, a pasta utilizada favoreceu a diminuição da inflamação e consequente reparo dos tecidos, fatos que classificam a pasta como biocompatível.

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

Biocompatibilidade.

ABSTRACT

Although it is a material widely used in Endodontics, calcium hydroxide paste does not have a broad spectrum of antimicrobial action, a factor that can lead to failure of endodontic treatment due to the permanence of the infectious process. Therefore, it is necessary to study the association of this paste with drugs, such as anti-inflammatory drugs, in order to increase the antimicrobial activity of this dressing. Then, the objective of this project was to evaluate the influence, action that diclofenac sodium microspheres will cause in a calcium hydroxide paste. Starting from the proportion of 1g of calcium hydroxide powder to 1mL of propylene glycol, 5% of microspheres were mixed with the paste and, using morphological and morphometric analysis, the tissue adjacent to the implants - with the medications - was evaluated in the subcutaneous of rats. The pastes were manipulated according to the test material and subsequently inserted into polyethylene tubes, in addition to the use of empty tubes for control, and the animals were evaluated for periods of 7 and 30 days. After these periods, the tissues adjacent to the implants were collected, histologically processed and stained in HE to characterize the inflammatory process at the site. In the period of 7 days, an intense inflammatory process was visualized in all experimental groups, with the presence of neutrophils. Within 30 days, there was regression of the inflammatory process installed in all groups. Although there were no differences in the addition of sodium diclofenac microspheres, the paste used favored the reduction of inflammation and consequent tissue repair, facts that classify the paste as biocompatible.

Keywords: Microspheres. Anti-inflammatory. Calcium hydroxide. Biocompatibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais e materiais testados.....	15
Figura 1 – Fotomicrografias.....	20
Figura 1 A – Reação tecidual do grupo 1 após 7 dias.....	20
Figura 1 B – Reação tecidual do grupo 2 após 7 dias.....	20
Figura 1 C – Reação tecidual do grupo 3 após 7 dias.....	20
Figura 1 D – Reação tecidual do grupo 4 após 7 dias.....	20
Figura 1 E – Reação tecidual do grupo 1 após 30 dias.....	20
Figura 1 F – Reação tecidual do grupo 2 após 30 dias.....	20
Figura 1 G – Reação tecidual do grupo 3 após 30 dias.....	20
Figura 1 H – Reação tecidual do grupo 4 após 30 dias.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2	OBJETIVO.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4	RESULTADOS.....	17
5	DISCUSSÃO.....	18
6	CONCLUSÕES.....	19
	REFERÊNCIAS.....	20
	GLOSSÁRIO	
	APÊNDICE	
	ANEXO	

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Em casos de lesões de cárie de acometimento pulpar ou traumas, pode-se observar a necrose do sistema de canais radiculares, que se contaminam por bactérias e seus subprodutos. Para removê-los, é feito o preparo biomecânico, que consiste na instrumentação dos canais aliada ao uso de substâncias irrigadoras, como o hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5%, promovendo a desinfecção antes de vedar a área. Contudo, há microrganismos que possam resistir ao preparo biomecânico e que futuramente ocasionem uma nova lesão endodôntica, tornando-se necessária a utilização de medicações intracanalais que os eliminem e garantam sucesso ao tratamento (BYSTROM et al., 1985; HAAPASALO et al., 2007).

A medicação mais usada nessas situações é obtida através da calcinação do carbonato de cálcio, até se transformar em óxido de cálcio e, quando hidratado, resulta em hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ (ESTRELA et al., 1995). Esse material consiste em um pó branco alcalino (pH 12,8) de baixa solubilidade. Para ser utilizado como medicação intracanal, há a necessidade de associar o $Ca(OH)_2$ ao propilenoglicol, um veículo que forma uma pasta passível de ser inserida no canal radicular - uma vez que, quando puro, o hidróxido de cálcio não apresenta consistência adequada para realizar tal função (ESTRELA et al., 1995; SIQUEIRA et al., 1999; MIZUNO et al., 2008; FREITAS et al., 2017).

A pasta de $Ca(OH)_2$ é amplamente utilizada devido às propriedades que apresenta, como ação antimicrobiana, biocompatibilidade e inibição de lipopolissacarídeo, uma endotoxina responsável por desencadear reações adversas no organismo (SAFAVI, NICHOLS, 1993; SAFAVI, NICHOLS, 1994; TANOMARU et al., 2003). Contudo, esse material possui algumas propriedades que poderiam ser melhoradas, tais como viscosidade, radiopacidade e dissociação iônica, o que motivou o início de estudos e testes da associação de outras substâncias às pastas de hidróxido de cálcio, criando um material de maior qualidade (ESTRELA et al., 1995; BASRANI et al., 2004; GUERREIRO-TANOMARU et al., 2012). Outra questão é a resistência de alguns tipos de bactérias à ação das pastas de $Ca(OH)_2$, como o *Enterococcus faecalis* (McHUGH et al., 2004). Dessa forma, torna-se fundamental a

incorporação de componentes que gerem maior atividade antimicrobiana a essa medicação intracanal (VALVERDE et al., 2017).

O estudo das propriedades biológicas, físicas, químicas e antimicrobianas se trata de uma etapa fundamental para desenvolver medicações intracanaís. Além disso, é importante que o material associado ao Ca(OH)_2 favoreça o reparo de tecidos periapicais e não interfira em sua biocompatibilidade. Esse reparo conta com agressão inicial ao tecido que estiver em contato com o Ca(OH)_2 - proveniente de seu pH alcalino - promovendo a migração de células inflamatórias e originando um processo inflamatório, cuja intensidade e progressão sofrem influência de fatores locais e sistêmicos. O processo descrito resulta na produção e liberação das citocinas interleucina 1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandinas (PGE_2), que modulam a inflamação (SCHRODER et al., 2006; HRABAK et al., 2008). O modulador TNF- α , secretado por macrófagos, atua na estimulação de linfócitos e de células osteoclástica durante a reabsorção óssea e aumenta a resposta vascular no local (SAFAVI, ROSSOMANDO 1991; DANIN et al., 2000).

Após o processo inflamatório inicial, as células encontradas no tecido em contato com o hidróxido de cálcio diminuem consideravelmente, devido a queda na expressão de citocinas pró inflamatórias, iniciando o reparo tecidual (ANDOLFATTO et al., 2012). O reparo tecidual envolve inflamação, formação de tecido de granulação, remodelação e liberação de mediadores químicos que estimulam a proliferação, migração, diferenciação e atividade celular (CONSOLARO 2009). A presença de colágeno no tecido conjuntivo que estiver em contato com os materiais significa uma forma de avaliação do reparo (BARTOLS et al., 2017; SILVA et al., 2017).

A primeira alternativa quando trata-se da potencialização da atividade antimicrobiana de materiais endodônticos é a associação de antibióticos ao Ca(OH)_2 , uma vez que já foi demonstrada a eficácia da Amoxicilina no controle da infecção bacteriana em comparação à pasta que está sendo avaliada SABER et al. 2012; SALEM-MILANI et al., 2013; VALVERDE et al., 2017). Outro antibiótico eficaz no tratamento contra o *Enterococcus faecalis* é a Linezolida, que possui amplo espectro e pode ser associada ao Ca(OH)_2 (PAVASKAR et al. 2012).

Outra alternativa é o uso de anti inflamatórios não estereoidais (AINES), que têm atividade antimicrobiana comprovada. Dastidar et al (2000) demonstraram que o

diclofenaco sódico - um AINE amplamente utilizado - inibe a síntese do DNA de bactérias Gram positivas e Gram negativas, revelando atividade antimicrobiana que é potencializada quando associado à Estreptomina (DUTTA et al. 2007).

Recentemente, demonstrou-se que a pasta de hidróxido de cálcio associada a AINES ou antibióticos diminuiu significativamente a formação de biofilmes de *Enterococcus faecalis* sem gerar alterações a seu pH. O diclofenaco sódico produziu resultados mais satisfatórios, uma vez que, ao contrário dos antibióticos, possibilita a modulação dos tecidos localmente e não gera a seleção de bactérias resistentes, além de reduzir a inflamação e dor provenientes de tratamento endodôntico (FREITAS et al., 2017).

É necessário que estas associações não interfiram nas propriedades físicas e químicas da pasta de Ca(OH)_2 , além de não gerar prejuízos ao organismo. Um exemplo é a associação de hidróxido de cálcio à clorexidina, que forma produtos de potencial carcinogênico - a paracloroanilina e espécie reativa de oxigênio (BARBIN et al., 2013).

Tendo em vista essas questões, é relevante a realização de uma pesquisa para avaliar as propriedades biológicas da microsferas de diclofenaco sódico que podem aumentar a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio, através de sua liberação lenta e controlada no organismo.

2. OBJETIVO

O propósito deste estudo é investigar a influência da adição de microesferas de diclofenaco sódico na biocompatibilidade da pasta de hidróxido de cálcio, após a implantação de tubos de polietileno no subcutâneo dorsal de ratos, usando como método de análise da reação tecidual adjacente aos implantes em relação a extensão e tipos de células presentes nos diferentes períodos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O quadro 1 mostra a distribuição dos materiais e proporções utilizados nos diferentes grupos experimentais.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais e materias testados

Grupos experimentais	Materiais
Grupo 1	Pó: Hidróxido de cálcio Veículo: propilenoglicol
Grupo 2	Pó: Hidróxido de cálcio + 5% de diclofenaco sódico Veículo: propilenoglicol
Grupo 3	Pó: Hidróxido de cálcio + 5% de microesferas de diclofenaco sódico Veículo: propilenoglicol
Grupo 4	Tubo de polietileno vazio (controle)

Fonte: elaborada pela autora.

O preparo das microesferas foi feito a partir do polímero Eudragit® S100, que foi dissolvido em acetona, e de diclofenaco sódico, que foi incorporado por agitação magnética a 25°C, seguindo a metodologia descrita anteriormente (GENARI et al., 2017; DORNELLES et al., 2018). A morfologia das microesferas carregadas com diclofenaco sódico foi caracterizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (JSM-TLLOA; JEOL, Tokyo, Japão).

O protocolo de pesquisa foi realizado na Faculdade de Odontologia de Araraquara e foi, previamente, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil (CEUA nº 08/2018-Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, anexo 3).

Para este projeto, foram utilizados 30 ratos da raça Wistar, adultos (75 dias), pesando em média 200g. Esses animais foram mantidos em gaiolas plásticas constantemente higienizadas, forradas com maravalha (trocada ao menos três vezes por semana), com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas, no

Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Recebiam ração (Guabi Nutri Labor, Brasil) e água *ad libitum*.

Foi implantado, no subcutâneo dorsal de cada rato, um tubo de polietileno (previamente esterilizado em óxido de etileno) de 1,5mm de espessura e 10mm de comprimento, de maneira randomizada. Foram feitos 5 implantes para cada material por período experimental.

Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo 0,08mL/100g de peso corporal de Cloridrato de Ketamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda - Brasil), concentração de 80mg/kg de peso corporal, associada uma dose de 0,04mL/100g de peso corporal de Cloridrato de Xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A - Brasil), na dose de 4mg/kg de peso do animal.

Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% na região dorsal dos ratos, foi feita uma incisão de 2cm com uma lâmina de bisturi nº 15, na direção da cabeça para a cauda. O tecido foi divulsionado e, posteriormente, os dois tubos preenchidos com material foram implantados. O local da incisão foi suturado em pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil). Então, os animais foram colocados em gaiolas identificadas de acordo com o grupo e o período experimental, e foram observados até a recuperação da anestesia. Para minimizar o desconforto pós-operatório dos animais, foi administrada dipirona sódica, na dosagem de 0,03mg para cada 100g de peso corporal.

Transcorridos os períodos de 7 e 30 dias, animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. Os tubos de polietileno, que continham os materiais, foram removidos juntamente dos tecidos adjacentes e fixados em formaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Após 48 horas, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos contendo os implantes e o tecido conjuntivo adjacente serão cortados com auxílio de um micrótomo (Micron, modelo HM 325). Cortes com 6µm de espessura foram aderidos à lâminas de vidro e corados com hematoxilina de Carazzi e eosina (H&E). Além disso, outros cortes foram aderidos à lâminas de vidro silanizadas para a realização das reações imuno-histoquímicas e de imuno-fluorescência.

Para a descrição das alterações morfológicas e captura das imagens, foi utilizado o microscópio Olympus (modelo BX-51, Japão) no qual está acoplada uma câmera de captura DP-71 (Olympus).

A partir dos cortes corados em H&E, foi realizada a descrição morfológica do tecido conjuntivo (cápsula) adjacente aos implantes. Nesta análise, foi considerada a presença ou não de processo inflamatório, bem como a sua extensão e o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas.

4. RESULTADOS

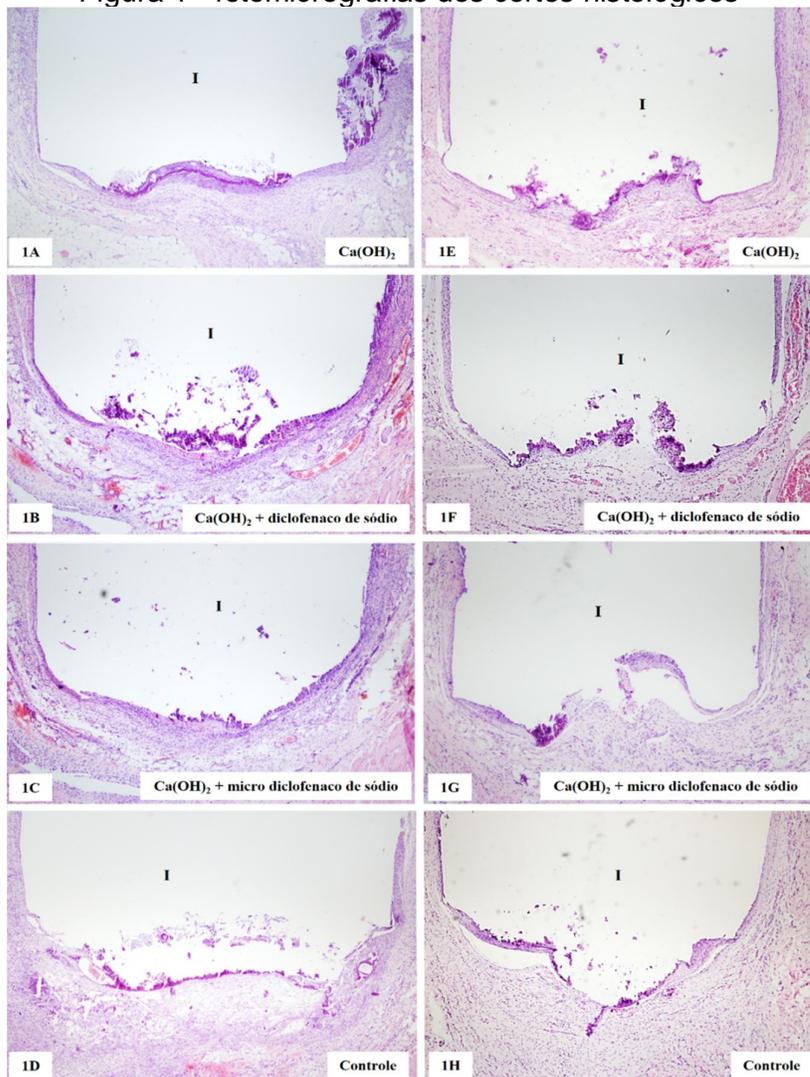
Nas imagens obtidas através da análise das lâminas, observa-se a reação no tecido conjuntivo adjacente aos implantes contendo os diferentes materiais nos períodos de 7 e 30 dias.

Em 7 dias, a presença de neutrófilos na cápsula adjacente aos implantes demonstra o processo inflamatório mais intenso de todos os grupos experimentais. Após 30 dias, verifica-se redução do processo inflamatório em todos os grupos.

Não foram observadas diferenças em fatores como extensão e tipo de células presentes entre os grupos da pasta de hidróxido de cálcio acrescida de diclofenaco sódico e o das microesferas deste medicamento, em ambos os períodos.

A partir dos cortes histológicos, foram obtidas fotomicrografias que ilustram porções da cápsula adjacente à abertura dos tubos implantados (I) no tecido subcutâneo após 7 (**Figs. 1A-1D**) e 30 (**Figs. 1E-1H**) dias de implantação. **Figuras 1A-1D** – cápsulas evidenciando numerosas células inflamatórias e áreas de necrose superficial adjacentes às pastas de hidróxido de cálcio. Após 30 dias (**Figs. 1E-1H**), pode ser observado uma cápsula fibrosa nas cápsulas; poucas células inflamatórias estão presentes. HE. 70X.

Figura 1 - fotomicrografias dos cortes histológicos



Fonte: elaborada pela autora.

5. DISCUSSÃO

A biocompatibilidade tecidual é uma das principais propriedades que as pastas de hidróxido de cálcio devem apresentar: elas não podem ser irritantes aos tecidos periapicais, com os quais estarão em contato direto. Um método de análise bastante utilizado para avaliar o tipo e extensão de reações inflamatórias causadas por diferentes materiais endodônticos é o implante em subcutâneo de ratos (CINTRA et al., 2017). Nesse estudo, a análise histológica avaliou o processo inflamatório inicial e a indução de sua regressão por diferentes materiais.

Os dados obtidos com a análise *in vivo* no subcutâneo de ratos apontaram que as pastas de hidróxido de cálcio induziram um processo inflamatório severo aos 7 dias, promovendo a necrose das áreas que estavam em contato íntimo com esses materiais. Aos 30 dias, foi possível observar a regressão desse processo e, dessa forma, o aumento do número de fibroblastos e fibras colágenas nas cápsulas. O pH alcalino do Ca(OH)_2 favorece a formação de áreas de necrose superficial (ESTRELA et al., 1995), cujas células induzem a migração de neutrófilos e células gigantes multinucleadas, promovendo a fagocitose e o reparo tecidual em períodos experimentais mais longos (ANDOLFATTO et al., 2012).

É sabido que o sistema de carregadores melhora fatores como estabilidade da droga (OURIQUE et al., 2008), biocompatibilidade e biodisponibilidade (GUINEBRETIERE et al., 2002) e controle de sua liberação no organismo (HERNANDEZ et al., 2013), sendo que este último se relaciona com a redução da dosagem e, conseqüentemente, dos efeitos adversos (PURI, PURI 2013). A associação de medicamentos feita não gerou alterações em relação a reação inflamatória, mas como promoveu sua regressão após 30 dias, pode ser considerada biocompatível.

Já foi demonstrado em estudos que a associação de pasta de hidróxido de cálcio ao diclofenaco sódico possui atividade antibifilme contra *E. faecalis* (de FREITAS et al., 2017) e induziu um processo inflamatório menos intenso que quando a pasta de hidróxido de cálcio usada sozinha. Entretanto, o presente estudo é o primeiro a analisar a biocompatibilidade dessa mistura, acrescida a microesferas de diclofenaco sódico, que geraram resultados promissores - mas ainda há a

necessidade de analisar suas propriedades físico-químicas para que seu uso clínico seja indicado.

6. CONCLUSÕES

Embora o uso de microesferas de diclofenaco de sódio não tenha produzido diferenças, os resultados obtidos apontam quem as pastas estudadas favorecem a regressão da reação inflamatória e reparo de tecidos. Sendo assim, podem ser consideradas biocompatíveis.

REFERÊNCIAS

Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, Bonetti-Filho I, Cerri PS. **Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide.** ISRN Dent. 2012;2012:904963.

Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. **Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications.** J Endod. 2004;30:413-7.

Barbin LE, Estrela C, Guedes DFC, Spanó JCE, Sousa-Neto MD, Pécora JD. **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. 2013;39:664-8.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. **The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals.** Endod Dent Traumatol. 1985;1:170-5.

Chavez de Paz LE. **Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms.** Appl Environ Microbiol 2009;75:1734–9.

Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, et al. **Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high plasticity MTA material.** J Endod 2017;43:774–8.

Consolaro A. **Inflamação e reparo.** 1ª ed. São Paulo: Dental Press; 2009.

da Silva GF, Cesário F, Garcia AMR, Weckwerth PH, Duarte MAH, de Oliveira RC, Vivan RR. **Effect of association of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic agents with calcium hydroxide pastes on their cytotoxicity and biocompatibility.** Clin Oral Investig. 2019. doi: 10.1007/s00784-019-02923-y.

Danin, J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L. **Tumor necrosis factor- alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions.** Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod. 2000;90:514– 517.

Dastidar SG *et al.* Chakrabarty. **The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis.** Int. J Antimicrob Agents. 2000;14:249-51.

de Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, Cavenago BC, Vivan RR, Duarte MAH, Weckwerth ACVB, Weckwerth PH. **Effect of the association of nonsteroidal anti-inflammatory and antibiotic drugs on antibiofilm activity and pH of calcium hydroxide pastes.** J Endod. 2017;43:131-4.

Dornelles NB Junior, Collares FM, Genari B, de Souza Balbinot G, Samuel SMW, Arthur RA, Visioli F, Guterres SS, Leitune VCB. **Influence of the addition of microsphere load amoxicillin in the physical, chemical and biological properties of an experimental endodontic sealer.** J Dent. 2018;68:28-33.

Dutta NK *et al.* **Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium.** Int J Antimicrob Agents. 2007;30:242-49.

Estrela C. *et al.* **Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes.** Int. Endod. J. 2001;34:341-45.

Estrela C, Sydney GB, Bammann L, Felipe Júnior O. **Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria.** Braz Dent J. 1995;6:85-90.

Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, Cavenago BC, Vivan RR, Duarte MAH, Weckwerth ACVB, Weckwerth PH. **Effect of the association of nonsteroidal anti-inflammatory and antibiotic drugs on antibiofilm activity and pH of calcium hydroxide pastes.** J Endod. 2017;43:131-4.

Genari B, Leitune VCB, Jornada DS, Camassola M, Pohlmann AR, Guterres SS, Samuel SMW, Collares FM. **Effect of indomethacin-loaded nanocapsules incorporation in a dentin adhesive resin.** Clin Oral Investig. 2017;21:437–46.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. **Comparative Analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates.** Basic Res Biol. 2013;39:346-50.

Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. **Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments.** Dent Traumatol. 2012;28:320-3.

Guinebretière S, Briançon S, Fessi H, Teodorescu VS, Blanchin MG. **Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy.** Mater Sci Eng C. 2002;21:137–142.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. **Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments.** J Endod. 2007;33:917-25.

Hernandez FJ, Hernandez LI, Pinto A, Schäfer T, Özalp VC. **Targeting cancer cells with controlled release nanocapsules based on a single aptamer.** Chem Commun Camb Engl. 2013;49:1285–7.

Hrabak A, Bajor T, Csuka I. **The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages.** Inflamm Res. 2008;57:75–83.

International Organization for Standardization. ISO 6876: **Dental Root Sealing Materials.** Geneva: The Organization; 2012.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. **pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro.** J Endod. 2004;30:218-9.

Mizuno M, Banzai Y. **Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated bronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental**

pulp cells to mineralized tissue forming cells by bronectin. Int Endod J. 2008;41:933-8.

Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery.** Int J Pharm. 2010;385:113–42.

Ourique AF, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. **Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study.** Int J Pharm. 2008;352:1–4.

Pavaskar R, de Ataide Ide N, Chalakkal P, Pinto MJ, Fernandes KS, Keny RV, Kamath A. **An *in vitro* study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide- and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis*.** J Endod. 2012;38:95-100.

Puri K, Puri N. **Local drug delivery agents as adjuncts to endodontic and periodontal therapy.** J Med Life. 2013;6:414–9.

Saber Sel-D, El-Hady SA. **Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an *in vitro* study.** Eur J Dent. 2012;6:43-50.

Safavi KE, Nichols FC. **Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide.** J Endod. 1993;17:76-8.

Safavi KE, Nichols FC. **Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment.** J Endod. 1994;20:127-9.

Safavi, K, Rossomando, EF. **Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis.** J Endod. 1991;17:12– 14.

Salem-Milani A, Balaei-Gajan E, Rahimi S, Moosavi Z, Abdolhahi A, Zakeri-Milani P, Bolourian M. **Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*.** J Dent (Tehran). 2013;10:16-22.

Schroder AK, von der Ohe M, Kolling U, Alstaedt J, Uciechowski P, Fleischer D *et al.* **Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators.** Immunology. 2006;119:317–27.

Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. **Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties.** J Biomed Mater Res A. 2014;102A:4336-45.

Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. **Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation.** Int Endod J. 2017;50 suppl 2:e95-e108.

Siqueira Jr. JF, Lopes HP. **Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review.** Int Endod J. 1999;32:361-9.