

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

JULIANA MACHADO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
ASSOCIADAS A DIFERENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS FRENTE ÀS LINHAGENS
DE *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 E ATCC 29212**

BAURU
2020

JULIANA MACHADO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
ASSOCIADAS A DIFERENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS FRENTE ÀS LINHAGENS
DE *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 E ATCC 29212**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira
Da Silva

BAURU

2020

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

M149a	<p>Machado, Juliana</p> <p>Atividade antibacteriana de pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes anti-inflamatórios frente às linhagens de enterococcus faecalis ATCC 4083 E ATCC 29212 / Juliana Machado. -- 2020. 24f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira Da Silva</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Hidróxido de Cálcio. 2. Anti-inflamatórios. 3. Atividade antibacteriana. 4. <i>Enterococcus faecalis</i>. I. Silva, Guilherme Ferreira da. II. Título.</p>
-------	--

JULIANA MACHADO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
ASSOCIADAS A DIFERENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS FRENTE ÀS LINHAGENS
DE *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 E ATCC 29212**

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

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Guilherme Ferreira Da Silva (Orientador)
Centro Universitário Sagrado Coração

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

Dedico este trabalho aos meus pais e
minha irmã, com carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui, com saúde e dedicação, agradeço por ter mantido a fé e esperança em mim para que eu não desistisse desse sonho. Agradeço também, por ter colocado pessoas especiais e importantes, que se fazem presente na minha vida, que apóiam minhas decisões e que diariamente me fazem evoluir para que eu alcance meus objetivos.

Agradeço ao meu pai **Marcos Augusto Machado** e minha mãe **Deise Pinheiro Romo Machado** por terem me dado todo o apoio e suporte durante todos esses anos, sem medir esforços para que eu pudesse chegar até aqui, por sempre estarem ao meu lado nos momentos de alegrias e tristezas, agradeço por terem acreditado e confiado em mim para que eu chegasse onde eu cheguei.

Agradeço a minha Irmã **Giovanna Machado** por sempre estar ao meu lado, compartilhando alegrias e depositando em mim confiança e muita admiração, pois é essa admiração que me mantém firme e me dá forças para nunca desistir.

Agradeço a minha dupla de clínica **Amanda Corredato Paiva** que dividiu comigo os medos, inseguranças e alegrias durante toda essa jornada. Agradeço também aos meus amigos que fizeram parte do meu dia a dia compartilhando as alegrias durante todos esses anos.

Agradeço a todos os meus professores, em especial ao meu orientador **Dr. Guilherme Ferreira Da Silva**, por ter me acompanhado nas clínicas, por me dar o privilégio de aprender com seus ensinamentos. Agradeço ao meu professor que hoje não está mais na instituição mas que fez parte da minha caminhada o **Dr. Paulo Henrique Weckewert** que foi meu mentor nos projetos de iniciação científica, por sempre exercer sua profissão com carinho e dedicação sempre me ajudando e passando seus ensinamentos para que eu pudesse chegar até aqui e quero agradecer também a minha professora **Dra. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira**

por ter aceito meu convite em fazer parte da banca examinadora, agradeço pelos seus ensinamentos durante as aulas e clínicas e por ser essa profissional excelente em todas as áreas que atua.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos” (Friedrich Nietzsche).

RESUMO

O hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ é um pó branco, altamente alcalino que, em endodontia, tem sido utilizado em pulpotomias, tratamento de perfurações radiculares, como componente de cimentos obturadores e como medicação intracanal, sendo que quando utilizado nesta última situação, é associado a um veículo com a finalidade de se obter a consistência de pasta. Assim, diferentes veículos têm sido propostos para associação ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$. A atividade antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ está relacionada a liberação de íons hidroxila. Estes íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que reagem com inúmeras biomoléculas. Apesar de sua ampla utilização, esta substância não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de microrganismos “*in vivo*”. O propósito da presente pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes pastas contendo hidróxido de cálcio associada as diferentes anti-inflamatórios, pastas puras de hidróxido de cálcio e pastas puras dos anti-inflamatórios sobre células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e ATCC 29212. O teste de susceptibilidade bacteriana frente às pastas foi realizado pelo método da difusão sobre ágar Mueller-Hinton escavado com poços de 4 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade e semeado com as linhagens em estudo. Também foi realizado o teste de contato direto com cones de papel embebidos com os microrganismos. Ainda, foi avaliado o pH de cada pasta por metodologia recomendada. Após a tabulação dos dados, foi realizada a análise estatística pelo teste ANOVA para comparação global, e teste de Tukey para comparações individuais, com nível de significância de 5%. Todos os grupos apresentaram ação frente à linhagem ATCC 4083 e a ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*. No entanto, as pastas de hidróxido de cálcio com anti-inflamatórios foram superiores aos demais grupos. Os materiais contendo hidróxido de cálcio mostraram um pH alcalino, enquanto que, nos demais grupos o pH foi neutro. Diante dos resultados obtidos com a presente pesquisa, podemos concluir que a pasta de hidróxido de cálcio associada aos anti-inflamatórios avaliados apresenta atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio. Anti-inflamatórios. Atividade antibacteriana. *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Calcium hydroxide [Ca(OH)₂] is a white, highly alkaline powder that, in endodontics, has been used in pulpotomies, treatment of root perforations, as a component of filling cements and as an intracanal medication, when used in the latter situation, it is associated with a vehicle for the purpose of obtaining the consistency of paste. Thus, different vehicles have been proposed for association with Ca(OH)₂. The antimicrobial activity of Ca(OH)₂ is related to the release of hydroxyl ions. These hydroxyl ions are highly oxidizing free radicals that react with numerous biomolecules. Despite its widespread use, this substance has not been shown to be effective on some strains of microorganisms "in vivo". The purpose of this research was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of different pastes containing calcium hydroxide associated with different anti-inflammatories, pure pastes of calcium hydroxide and pure pastes of anti-inflammatories on planktonic cells of *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 and ATCC 29212. The bacterial susceptibility test against the pastes was carried out using the diffusion method on Mueller-Hinton agar excavated with 4 mm diameter and 3 mm deep wells and seeded with the studied strains. The direct contact test was also performed with paper cones embedded with the microorganisms. In addition, the pH of each paste was evaluated using the recommended methodology. After data tabulation, statistical analysis was performed using the ANOVA test for global comparison, and the Tukey test for individual comparisons, with a significance level of 5%. All groups showed action against the ATCC 4083 strain and the ATCC 29212 strain of *Enterococcus faecalis*. However, calcium hydroxide pastes with anti-inflammatories were superior to the other groups. The materials containing calcium hydroxide showed an alkaline pH, while in the other groups the pH was neutral. In view of the results obtained with the present research, we can conclude that the calcium hydroxide paste associated with the anti-inflammatories evaluated has antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Calcium hydroxide. Anti-inflammatory. Antibacterial activity. *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem ilustrativa do teste de difusão radial em ágar.17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Média dos halos de inibição nos diferentes grupos experimentais.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE Anti-inflamatórios não esteroides

C. albicans *Cândida albicans*

E. coli *Eschericia coli*

E. faecalis *Enterococcus faecalis*

M. tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis*

S. aureus *Staphylococcus aureus*

St. sanguis *Streptococcus sanguis*

St. sobrinus *Streptococcus sobrinus*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	12
2.	OBJETIVOS	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1.	Das pastas utilizadas.....	16
3.2.	Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão das pastas sobre a superfície de ágar.....	16
3.3.	Avaliação da atividade antibacteriana das pastas pelo método do contato direto em cones de papel	17
3.4.	Análise do pH	18
3.5.	Análise estatística.....	19
4.	RESULTADOS	20
4.1.	Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão das pastas sobre a superfície de Agar	20
4.2.	Avaliação da atividade antibacteriana das pastas pelo método do contato direto em cones de papel	20
4.3.	Análise do pH	21
5.	DISCUSSÃO	22
6.	CONCLUSÕES	24
	REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O Hidróxido de Cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, tem sido utilizado na endodontia em pulpotomias, tratamento de perfurações radiculares, como componente de cimentos obturadores e como medicação intracanal, sendo que quando utilizado nesta última situação, é associado a um veículo com a finalidade de se obter a consistência de pasta. Assim, diferentes veículos têm sido propostos para associação ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ESTRELA et al., 2001).

O emprego do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ baseia-se na sua ação antisséptica e biológica sobre microrganismos, devido ao seu elevado pH que permite a liberação dos íons hidroxila, que são radicais altamente oxidantes capazes de provocar danos na membrana citoplasmática das bactérias, desnaturação de proteínas e danos diretos ao DNA (ESTRELA et al., 1998; SIQUEIRA et al., 1999). Esta atividade antimicrobiana também é resultante da presença íons cálcio que remove gás carbônico, fonte respiratória de bactérias anaeróbias (KONTAKIOTIS et al., 1995).

As pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, em diferentes veículos e concentrações têm sido o material de escolha como medicação intracanal por seu alto poder alcalinizante criando um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano (ESTRELA et al., 1998, SIQUEIRA et al., 1999, FAVA et al., 1999).

Gomes et al. (2002) revelaram que a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi influenciada pelo tipo de veículo utilizado, sendo que a melhor atividade antimicrobiana foi obtida com veículos oleosos. Este estudo revelou que bactérias anaeróbias Gram negativas são mais susceptíveis ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em relação aos microrganismos Gram positivos facultativos.

A atividade antimicrobiana de diferentes pastas de hidróxido de cálcio frente a *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *E. faecalis*, *St. sobrinus*, *St. sanguis*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* foi avaliada pelo método da difusão por Souza-Filho et al. (2008). Os autores utilizaram no estudo as pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2%, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2% + iodofórmio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2% + óxido de zinco e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + água. Os resultados revelaram que todas as pastas demonstraram alguma atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados. *C. albicans*, *E. faecalis* e *St. sanguis* foram os microrganismos mais resistentes. *St. mutans* revelou grandes zonas de inibição no experimento.

Apesar de sua ampla utilização, esta substância não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de microrganismos *in vivo*. Um desses microrganismos é o *E. faecalis*.

Os fatores de virulência do *E. faecalis* tem sido amplamente estudados. Esses microrganismos produzem citolisinas com atividade sobre hemácias humanas, ovinas e de equinas. A substância de agregação é uma proteína codificada por plasmídeos responsável pela aglutinação dos microrganismos para facilitar a troca entre plasmídeos. As estirpes de *E. faecalis* produzem feromonas, peptídeos capazes de amplificar a transferência de DNA plasmidial por estirpes em processo conjugativo e também de amplificar a resposta inflamatório durante o processo infeccioso (KAYAOGU; ØRSTAVIK, 2004).

A recuperação frequente do *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (SUNDQVIST et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; RÖÇAS et al. 2004).

Demonstram alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento e este é um dos poucos microrganismos que tem mostrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002).

Diante da resistência do *E. faecalis* ao Ca(OH)_2 , diferentes substâncias têm sido utilizadas no preparo das pastas a fim de potencializar a sua ação antimicrobiana frente a esse microrganismo. Estas substâncias poderiam ser as drogas anti-inflamatórias.

Vários estudos recentes têm revelado que anti-inflamatórios não esteróides (AINES) possuem atividade antimicrobiana comprovada. A atividade antimicrobiana do diclofenaco sódico está alicerçada na hipótese de danos ao DNA bacteriano, pela incapacidade de incorporação da timina na dupla fita do DNA (DASTIDAR et al., 2000, DUTTA et al., 2007).

Dastidar et al.(2000) demonstraram que o diclofenaco sódico tem a capacidade de inibir a síntese de DNA bacteriana exercendo assim uma ação altamente bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Nesse estudo os pesquisadores avaliaram o efeito bactericida e bacteriostático do anti-inflamatório sob quatro variáveis de tempo frente a uma linhagem de *E. coli* K12 C600 e uma de *S. Aureus*16 NCTC 6571. Os resultados revelam que a concentração inibitória mínima para ambas bactérias foi de 50 mg/L. Ao se adicionar 100 mg/L da droga sobre as linhagens bacterianas, foi observado uma regressão do número de

unidades formadoras de colônias (UFC) de $2,2 \times 10^8$ inicialmente (2 horas), chegando a zero variável de 18 horas.

Dutta et al. (2007) realizaram teste de sinergismo, utilizando a técnica de difusão em discos de papel, para avaliar a atividade antibacteriana do diclofenaco sódico. Nesse teste foi verificada a possibilidade de associação de diclofenaco sódico na concentração de 100 µg com estreptomicina em concentração de 10 µg. Os testes *in vivo* e *in vitro* entre outros testes realizados comprovaram a ação antimicrobiana do diclofenaco e a potencialização quando associado a outra droga.

Mazumdar et al. (2009) em uma revisão, revelaram que isolados clínicos de *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *Mycobacterium* spp. são sensíveis ao diclofenaco sódico, e que *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *M. Tuberculosis* demonstram sensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais.

Segundo Freitas et al. (2017) a atividade antimicrobiana do anti-inflamatório diclofenaco sódico também foi comprovada quando associado ao hidróxido de cálcio sobre biofilme de *E. faecalis*. Freitas et al. (2017) afirmam que essa associação não altera o pH da pasta e pode representar uma alternativa como curativo de demora, uma vez que podem atuar topicamente sobre os tecidos apicais no controle da inflamação, reduzindo a dor pós-operatória, além de não contribuir para o aparecimento de linhagens resistentes. Além disso, pastas de Ca (OH)₂ associadas com diferentes drogas (AINES ou antibióticos) não são citotóxicas e apresentam biocompatibilidade após a implantação em tecido subcutâneo de ratos (SILVA et al., 2020).

Assim, diante da importância do assunto em questão, e dos poucos trabalhos na literatura sobre essas associações, torna-se viável e oportuno a realização da presente pesquisa. Diante do exposto, avaliar a eficácia *in vitro* de diferentes pastas contendo hidróxido de cálcio associado com diferentes anti-inflamatórios, pastas puras de hidróxido de cálcio e pastas puras dos anti-inflamatórios frente às células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e 29212, torna-se a justificativa da presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Avaliar a eficácia *in vitro* de diferentes pastas contendo hidróxido de cálcio associado com diferentes anti-inflamatórios, pastas puras de hidróxido de cálcio e pastas puras dos anti-inflamatórios frente às células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e 29212.

2.2. *Objetivos específicos*

a) Determinar a atividade antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio pelo método de difusão frente às células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e 29212;

b) Determinar a atividade antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio associada aos anti-inflamatórios diclofenaco sódico, ibuprofeno, tenoxicam, meloxicam, piroxicam e nimesulida pelo método de difusão frente às células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e 29212;

c) Determinar a atividade antibacteriana de pastas de diclofenaco sódico, ibuprofeno, tenoxicam, meloxicam, piroxicam e nimesulide puras pelo método de difusão frente às células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e 29212;

d) Determinar a atividade antibacteriana de todas as pastas do experimento pelo método do contato direto frente às células planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 e 29212.

e) Determinar o pH de todas as pastas testadas neste experimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Das pastas utilizadas

Para as análises propostas foram utilizadas as seguintes pastas para os grupos de teste: Grupo 1: pasta de hidróxido de cálcio pura; Grupo 2: pasta de hidróxido de cálcio + diclofenaco sódico (10% do anti-inflamatório peso/peso); Grupo 3: pasta de hidróxido de cálcio + ibuprofeno (10% do anti-inflamatório peso/peso); Grupo 4: pasta de hidróxido de cálcio + tenoxicam (10% do anti-inflamatório peso/peso); Grupo 5: pasta de hidróxido de cálcio + meloxicam (10% do anti-inflamatório peso/peso); Grupo 6: pasta de hidróxido de cálcio + piroxicam (10% do anti-inflamatório peso/peso); Grupo 7: pasta de hidróxido de cálcio + nimesulide (10% do anti-inflamatório peso/peso); Grupo 8: pasta pura de diclofenaco sódico; Grupo 9: pasta pura de ibuprofeno; Grupo 10: pasta pura de tenoxicam; Grupo 11: pasta pura de meloxicam; Grupo 12: pasta pura de piroxicam; Grupo 13: pasta pura de nimesulide.

Para o preparo das pastas foi utilizado o veículo propilenoglicol até se obter a consistência de creme dental.

3.2. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão das pastas sobre a superfície de ágar

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* pelo método da difusão, as cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC4083 e a ATCC 29212 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) foram reativadas sobre a superfície de placas de ágar M-Enterococcus. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, em condições atmosféricas de aerobiose por 24-48 h. Após o período de ativação, a linhagem foi testada quanto à pureza da cultura e novamente identificada por métodos padrões de identificação bacteriana.

A partir das culturas, cinco colônias foram inoculadas em tubos contendo 4mL de caldo BHI estéril e incubados "overnight" a 37°C, em condições atmosféricas de aerobiose. Estas sub-culturas em caldo BHI foram transferidas para tubos contendo 5mL de solução salina estéril a fim de se obter uma turbidez padrão referente à escala 0,5 de Mac Farland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹.

Placas de Petri de 15x150 mm preparadas com ágar Mueller-Hinton (Merck®) foram escavadas em poços com 4 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. A superfície de cada placa foi semeada com uma zaragatoa de algodão estéril embebida na suspensão padrão, tomando-se o cuidado de preservar as escavações sem sementeira. Após a sementeira, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para absorção do inóculo.

As pastas utilizadas, descritas no item 3.1, foram manipuladas a partir do pó acrescido do veículo propilenoglicol até se obter a consistência de creme dental. Seringas estéreis de 3mL foram utilizadas para o preenchimento dos poços com as diferentes pastas.

Após o preenchimento dos poços, as placas foram mantidas em temperatura ambiente para pré-incubação por duas horas e após serão incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, utilizando-se um paquímetro digital, os halos de inibição bacteriana foram mensurados em milímetros sob luz transmitida. Os testes foram realizados em triplicata (Figura 1).



Figura 1: Imagem ilustrativa do teste de difusão radial em ágar.

3.3. Avaliação da atividade antibacteriana das pastas pelo método do contato direto em cones de papel

Para se avaliar a atividade antibacteriana das pastas estudadas, foi utilizada a técnica do contato direto das pastas com cones de papel contaminados com a linhagem ATCC 4083 e ATCC 29212 de *E. faecalis*, segundo Weckwerth et al., 2011.

A partir das placas de ativação das linhagens bacterianas, cinco colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI(Merck®) que foi incubado a 37°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL⁻¹. Assim, cones de papel absorvente estéreis (Tanari, Tanariman Indústria LTDA, Manacaru, Brasil), foram imersos por cinco minutos na suspensão bacteriana para contaminação. Após este período, estes cones foram distribuídos em placas de Petri estéreis e foram cobertas com todas as diferentes pastas. Um cone foi coberto com salina estéril e servirá como controle. As placas foram mantidas em câmara úmida em estufa. Nos intervalos de tempo de 6, 24 e 72 horas, os cones foram removidos do contato com as pastas e foram imersos em tubos contendo 5 mL de caldo Letheen (Difco) estéreis, que foram incubados a 37°C por 48 horas e avaliados quanto à turbidez macroscópica. Subsequentemente, 100 µL do caldo Letheen foi transferido para tubos contendo 5 mL de caldo BHI (Merck®) que foi incubado nas mesmas condições do caldo Letheen. Após 48 horas, de todos os tubos foram retiradas alíquotas de 100 µL que foram semeadas na superfície do ágar M-Enterococcus (Merck®), a fim de se determinar a viabilidade bacteriana. Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob condições assépticas e em triplicata.

3.4. Análise do pH

Para análise do pH, 10 tubos de polietileno de 1 cm serão utilizados. Os tubos foram preenchidos com auxílio de espiral Lentulo e, em seguida, imersos em 10 frascos de vidro individualmente contendo 20 mL de água deionizada. Os frascos foram vedados hermeticamente e levados à estufa a 37° C. As avaliações foram realizadas nos períodos de 3, 24, 72 e 168 horas (7 dias), sendo que a cada período, os espécimes foram cuidadosamente retirados dos frascos e imersos em um novo tubo com o mesmo volume de água deionizada. A vidraria foi previamente tratada com ácido nítrico, para evitar qualquer tipo de interferência nos resultados. Um pHmetro foi utilizado para determinação do pH, tomando-se o cuidado em verificar a precisão do aparelho realizando medições constantes de tampões conhecidos em pH 4,7 e 14. O vidro, após a remoção do espécime, foi levado a um

agitador onde permanecerá por 5 segundos. Após a agitação, o líquido foi vertido em um Becker e, então, colocado em contato com o eletrodo do pHmetro. A temperatura da sala foi de 25° C para aferição do pH. A água deionizada foi empregada como controle sendo medido seu pH em todos os períodos de análise.

3.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* *GraphPadPrism 5* selecionando os testes estatísticos indicados para cada análise, com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão das pastas sobre a superfície de Agar

Os resultados da avaliação antimicrobiana das diferentes pastas evidenciaram que todos os grupos apresentaram ação frente à linhagem ATCC 4083 e a ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*. Além disso, pode ser observado halos de inibição significativamente maiores nos grupos em que houve a adição de drogas à pasta de hidróxido de cálcio em comparação aos demais grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Média dos halos de inibição nos diferentes grupos experimentais.

	ATCC 4083	ATCC 29212
Grupo 1	26 ^a	25 ^a
Grupo 2	31,2 ^b	30 ^b
Grupo 3	31 ^b	30,2 ^b
Grupo 4	30 ^b	31 ^b
Grupo 5	31,1 ^b	30,3 ^b
Grupo 6	31 ^b	30 ^b
Grupo 7	30,2 ^b	30 ^b
Grupo 8	26,8 ^a	26,8 ^a
Grupo 9	27 ^a	26 ^a
Grupo 10	26 ^a	25,9 ^a
Grupo 11	26,4 ^a	26,3 ^a
Grupo 12	26,1 ^a	26 ^a
Grupo 13	25,9 ^a	26 ^a

*Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

4.2. Avaliação da atividade antibacteriana das pastas pelo método do contato direto em cones de papel

As pastas de hidróxido de cálcio contendo as drogas apresentaram um efeito antibacteriano maior para ambas as linhagens em comparação aos demais grupos experimentais ($p \leq 0,05$). A comparação entre as pastas pura de hidróxido de cálcio

ou somente com os anti-inflamatórios não mostrou diferença estatística em relação à atividade antimicrobiana contra as linhagens de *Enterococcus faecalis*.

4.3. Análise do pH

A água destilada dos frascos contendo as diferentes pastas com hidróxido de cálcio avaliadas apresentou pH alcalino em todos os períodos, variando entre 10 e 11. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre estes grupos experimentais. Nos grupos de 8 a 13, foi observado um pH neutro após os diferentes períodos experimentais.

5. DISCUSSÃO

O *Enterococcus faecalis* é um microrganismo extensivamente relacionado com insucesso do tratamento endodôntico (SUNDQVIST et al., 1998; Röças et al. 2003). Devido à sua alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento endodôntico, é um dos poucos micro-organismos que tem demonstrado resistência *in vitro* ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002).

No presente estudo empregaram-se duas metodologias, sendo a difusão radial uma delas, que é amplamente utilizada nos testes antimicrobianos de materiais endodônticos (RIBEIRO et al., 2010). No entanto, a mesma apresenta algumas limitações; como a falta de padronização da densidade do inóculo que, geralmente, é feita pela turbidimetria referente à escala 0,5 de Mac Farland, meio de cultura adequado para os testes, viscosidade do ágar, condições de estocagem das placas favorecendo a desidratação e conseqüente baixo desempenho do ágar, número de testes por placa de cultura e tempo e temperatura adequados de incubação (PUMAROLA et al., 1992). Além disso, são testes qualitativos, que revelam somente a sensibilidade da linhagem bacteriana expressa em milímetros de halo de inibição e, assim, não permitem distinguir entre propriedades bactericida e bacteriostática dos materiais testados (TOBIAS, 1988).

O outro teste empregado foi o de contato direto, no qual as bactérias são colocadas em contato direto com os materiais testados, durante determinados períodos de tempo, superando algumas das desvantagens dos testes de difusão sobre ágar. Os testes de contato direto consiste de métodos quantitativos e muito reprodutíveis que simulam o contato da bactéria com cimento endodôntico dentro do canal radicular. Também, permite que os efeitos dos cimentos em vários estágios da reação de presa sobre a viabilidade da bactéria possa ser avaliados (ELDENIZ et al., 2006). O método, também, oferece um melhor controle de fatores interferentes nos testes da difusão e tem sido amplamente utilizado nas pesquisas com materiais endodônticos (SLUTZKY-GOLDBERG et al., 2008).

O presente estudo analisou o efeito de diferentes pastas de hidróxido de cálcio e anti-inflamatórios sobre duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*, uma isolada de infecção do canal radicular (ATCC 4083) e outra de infecção urinária

(ATCC 29212). Nossos resultados mostraram que a associação de anti-inflamatórios à pasta de hidróxido de cálcio, aumentou a atividade antibacteriana deste curativo contra ambas as linhagens de *Enterococcus faecalis* em comparação aos outros grupos. Este resultado está de acordo com estudo prévio que demonstrou que a adição de AINES à pasta de hidróxido de cálcio aumenta, significativamente, a atividade antibiofilme sobre o *Enterococcus faecalis*, (FREITAS et al., 2017). Apesar das pastas puras de hidróxido de cálcio ou somente com anti-inflamatórios terem apresentados atividade antimicrobiana, esta ação foi maior nos curativos em que havia hidróxido de cálcio e anti-inflamatórios, evidenciando a potencialização do efeito deste tipo de medicação intracanal.

Em relação ao pH foi observado que a adição de diferentes medicações não interferiu no pH da pasta de hidróxido de cálcio, visto que, induziram um pH alcalino o que está de acordo com Freitas et al. (2017). As pastas contendo somente os anti-inflamatórios apresentaram um pH neutro, uma vez que, o aumento do pH está relacionado à liberação de íons hidroxila o que, provavelmente, não ocorre nestes produtos.

Apesar dos resultados promissores, outros estudos são necessários para estabelecer a concentração ideal dos anti-inflamatórios, a ser utilizada em associação à pasta de hidróxido de cálcio. Além disso, há necessidade da análise de outras propriedades físico-químicas e biológicas para indicação destas medicações na prática clínica.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com a presente pesquisa, podemos concluir que a pasta de hidróxido de cálcio associada aos anti-inflamatórios avaliados apresenta atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*.

REFERÊNCIAS

ESTRELA, Carlos et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **International endodontic journal**, v. 34, n. 5, p. 341-345, 2001.

ESTRELA, Carlos et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 1, p. 15-17, 1998.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International endodontic journal**, v. 32, n. 5, p. 361-369, 1999.

KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M.; GEORGOPOULOU, M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **International endodontic journal**, v. 28, n. 6, p. 285-289, 1995.

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International endodontic journal**, v. 32, n. 4, p. 257-282, 1999.

GOMES, Brenda Paula Figueiredo de Almeida et al. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. **Brazilian dental journal**, v. 13, n. 3, p. 155-161, 2002.

SOUZA-FILHO, Francisco José de et al. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Brazilian dental journal**, v. 19, n. 1, p. 28-33, 2008.

KAYAOGU, Güven; ØRSTAVIK, Dag. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Dental Traumatology**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 1995.

EVANS, Matthew et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International endodontic journal**, v. 35, n. 3, p. 221-228, 2002.

DASTIDAR, Sujata G. et al. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 14, n. 3, p. 249-251, 2000.

DUTTA, Noton Kumar et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, n. 3, p. 242-249, 2007.

MAZUMDAR, K. et al. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug target. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, n. 8, p. 881, 2009.

DE FREITAS, Rafaela Pignatti et al. Effect of the association of nonsteroidal anti-inflammatory and antibiotic drugs on antibiofilm activity and pH of calcium hydroxide pastes. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 1, p. 131-134, 2017.

DA SILVA, Guilherme Ferreira et al. Effect of association of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic agents with calcium hydroxide pastes on their cytotoxicity and biocompatibility. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 2, p. 757-763, 2020.

PUMAROLA, Jose et al. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 74, n. 2, p. 216-220, 1992.

RÔÇAS, Isabela N.; SIQUEIRA JR, José F.; SANTOS, Kátia RN. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. **Journal of endodontics**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

SUNDQVIST, Göran et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

TOBIAS, R. S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. **International Endodontic Journal**, v. 21, n. 2, p. 155-160, 1988.