

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADAS À BIOPRODUTOS FRENTE A LINHAGENS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS

Antibacterial activity in vitro of calcium hydroxide paste associated to bioproducts against on Gram-positive and Gram-negative strains

Vanessa Raquel Greatti¹

Paulo Henrique Weckwerth²

Isabela Tomazini Sabino³

Rodrigo Ricci Vivan⁴

Marco Antonio Hungaro Duarte⁵

Fernando Tozze Alves Neves¹

¹Universidade Sagrado Coração, Bauru/SP, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas- Universidade Sagrado Coração, Bauru/SP, Brasil

³FOB-USP, Bauru/SP, Brasil

⁴Departamento de Odontologia – Universidade Sagrado Coração, Bauru/SP, Brasil

⁵Departamento de Endodontia e Materiais Dentários – FOB- USP, Bauru/SP, Brasil

Recebido em: 07/10/2013

Aceito em: 29/11/2013

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioproductos frente a linhagens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

RESUMO

Introdução: o hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 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

Ca(OH)₂. A atividade antimicrobiana do Ca(OH)₂ está relacionada a liberação de íons hidroxila. Apesar de sua ampla utilização, esta substância não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de micro-organismos *in vivo*. **Objetivo:** o propósito da presente pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de várias pastas de Ca(OH)₂ associadas com bioprodutos contra linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. **Métodos:** os testes de susceptibilidade bacteriana frente às pastas, aos bioprodutos na forma de extratos e aos géis foram realizados pelo método da difusão, sobre ágar Mueller-Hinton. Os dados foram submetidos a análise estatística, empregando-se o teste Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. **Resultados e Discussão:** a clorexidina, tanto a 1% como a 2%, mostrou grande atividade antibacteriana pura, na forma de gel e associada como veículo ao Ca(OH)₂, estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Todas as pastas de Ca(OH)₂ revelaram efetividade contra todos os micro-organismos testados com exceção da pasta cujo veículo foi o óleo de alho. Frente ao *St. pyogenes*, somente as pastas de clorexidina 1% e 2% revelaram efetividade. As pastas de Ca(OH)₂ cujos veículos puros revelaram atividade antibacteriana, não foram potencializadas para atividade antibacteriana. **Conclusão:** na presente pesquisa, focada ao emprego de produtos naturais na terapia endodôntica, não pudemos revelar a potencialização das pastas de Ca(OH)₂ pelos bioprodutos puros, que revelaram atividade antibacteriana contra algumas das linhagens estudadas.

Palavras-chave: hidróxido de cálcio. Medicação Intracanal. Bioprodutos. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Introduction: calcium hydroxide Ca(OH)₂ is a highly alkaline white powder that has been used in Endodontics in pulpotomies, treatment of root perforations, as component of sealers and intracanal medication; when used for the latter purpose, it is associated with a vehicle to achieve a paste consistency. 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. Despite its wide utilization, this substance has not been demonstrated to be effective against some microorganism stains *in vivo*. **Objective:** this study evaluated the *in vitro* antibacterial activity of several Ca(OH)₂ pastes associated with bioproducts against ATCC strains

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioprodutos frente a linhagens gram positivas e gram negativas. SALUSVITA, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à linhagens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

of *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Methods:** the bacterial susceptibility test to the pastes of bioproducts in extract and gel was analyzed by the paste diffusion method on Mueller-Hinton agar. Data were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis test at a significance level of 5%. **Results and Discussion:** chlorhexidine, both at 1% and 2%, presented wide antibacterial activity both pure, in gel and associated as vehicle to Ca(OH)_2 , with statistical significance ($p < 0.05$). All Ca(OH)_2 pastes were effective against all microorganisms tested, except for the paste with garlic oil as vehicle. Concerning the *St. pyogenes*, only 1% and 2% chlorhexidine pastes were effective. The Ca(OH)_2 pastes whose pure vehicles presented antibacterial activity were not strengthened for the antibacterial activity. **Conclusion:** taking into consideration the use of natural products in the endodontic therapy it was not observed enhancement of the Ca(OH)_2 pastes by these products, which, in turn, revealed antibacterial activity against some of the studies strains.

Keywords: Calcium hydroxide. Intracanal medication. Bioproducts. Antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

O hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 caracteriza-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g L^{-1} de água, à 25°C). É obtido pela calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio que, após hidratação resulta em hidróxido de cálcio (ESTRELA, PESCE, 1996).

Em Endodontia o Ca(OH)_2 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 Ca(OH)_2 (ESTRELA *et al.*, 2001).

O emprego do Ca(OH)_2 em casos de necrose pulpar tem o propósito de promover ação antisséptica sobre micro-organismos, além da ação biológica, atributos que são conseguidos pelo elevado pH através da liberação de íons hidroxila e liberação de íons cálcio, respectivamente.

A atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 está relacionada a liberação de íons hidroxila. Estes íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que reagem com inúmeras biomoléculas.

Siqueira e Lopes, 1999, revelaram que os mecanismos de atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 são caracterizados pelos danos diretos a membrana citoplasmática bacteriana, desnaturação proteica e danos ao DNA bacteriano.

Evans *et al.*, 2003, avaliando a atividade antimicrobiana de duas pastas de Ca(OH)_2 em dentina bovina contaminada com *Enterococcus faecalis*, revelaram a melhor eficiência da pasta com veículo clorexidina a 2%.

Várias substâncias têm sido associadas ao Ca(OH)_2 com o propósito de potencializar sua ação antisséptica.

Novos veículos para pastas de Ca(OH)_2 , como por exemplo, fitoterápicos, devem ser testados com o objetivo de avaliar uma provável potencialização da pasta para eliminar *E. faecalis* e outros micro-organismos de canais radiculares, já que estes bioprodutos têm revelado atividade antimicrobiana frente a vários micro-organismos.

O propósito da presente pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de várias pastas de Ca(OH)_2 associadas com os bioprodutos extrato hidro-alcoólico de *Arctium lappa* (bardana), *Casearia sylvestris* (guaçatonga), *Piper umbellatum* (pariparoba), *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira vermelha), óleo de *Allium sativum* (alho) e extrato da própolis, contra linhagens de *E. faecalis* (ATCC 19433 e 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Como controle positivo utilizou-se clorexidina em propilenoglicol a 1 e 2% e controle negativo o propilenoglicol puro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos:

As partes utilizadas das plantas foram: folhas, talo e casca especificadas na Tabela 1. Estas foram submetidas ao processo de moagem por meio de moinho de facas e tamisação em malha (212 mm). Após este processo, o pó obtido foi fracionado em frascos contendo 6,5 gramas e 100 mL de álcool 70°GL. As soluções obtidas foram submetidas aos processos de aquecimento 40°C e agitação por 10 minutos. Este processo foi realizado durante sete dias. Após este período, os extratos foram filtrados a vácuo (para frascos esterilizados) e envasados em capela de fluxo laminar.

Para o alho comercial, utilizou-se um espremedor de alho e pesou-se a mesma massa, porém este foi incorporado diretamente à

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioprodutos frente a linhagens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à linhangens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

uma solução hidroalcoólica (70°GL), posteriormente realizou-se a mesma metodologia anteriormente descrita.

Tabela 1 - Partes utilizadas na preparação dos extratos

Nome Científico	Parte utilizada
<i>Arctium lappa</i> (Bardana)	Folhas
<i>Casearia sylvestris</i> (Guaçatonga)	Folhas e talo
<i>Piper umbellatum</i> (Pariparoba)	Folhas e talo
<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira-da-praia)	Casca
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Aroeira vermelha)	Casca
<i>Allium sativum</i> (alho comercial)	Bulbo

A aroeira-da-praia foi obtida da empresa Max Pharma São Paulo/SP Brasil, enquanto as demais foram adquiridas pela empresa Santos Flora (São Paulo/SP, Brasil).

O óleo de *Allium sativum* foi extraído de cápsulas de alho 250 mg do fabricante Vadequímica São Paulo/SP, Brasil e o extrato da própolis utilizado foi glicólico da empresa Purifarma São Paulo/SP, Brasil.

Processo para obtenção dos géis:

A concentração dos bioprodutos nos géis foi de 10% em relação ao volume final, utilizou-se 10 mL do extrato para cada 100 gramas do gel; foram utilizados também clorexidina 1% e 2% em propilenoglicol como controle positivo, e propilenoglicol como controle negativo e os mesmos foram manipulados na Farmácia Vêritas Bauru/SP, Brasil.

Processo para obtenção das pastas:

As pastas de Ca(OH)_2 foram manipuladas a partir do pó até se obter a consistência de creme dental (tabela 2).

Tabela 2 - Pastas de Hidróxido de Cálcio e seus diferentes veículos utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana

Ca(OH) ₂ + clorexidina a 1%
Ca(OH) ₂ + clorexidina a 2%
Ca(OH) ₂ + propilenoglicol
Ca(OH) ₂ + extrato de própolis
Ca(OH) ₂ + extrato hidro-alcoólico de bardana
Ca(OH) ₂ + extrato hidro-alcoólico de guaçatonga
Ca(OH) ₂ + extrato hidro-alcoólico de pariparoba
Ca(OH) ₂ + extrato hidro-alcoólico de aroeira-vermelha
Ca(OH) ₂ + extrato hidro-alcoólico de aroeira-da-praia
Ca(OH) ₂ + extrato hidro-alcoólico de alho comercial
Ca(OH) ₂ + óleo de alho

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioprodutos frente a linhagens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

MÉTODO DA DIFUSÃO

Para o teste de contato direto utilizou-se 20 µL para o preenchimento de poços escavados em placas de Mueller-Hinton ágar.

Seringas estéreis de 3 mL foram utilizadas para o preenchimento dos poços com gel e pasta no mesmo ágar.

Após o preenchimento dos poços, as placas foram mantidas em temperatura ambiente para pré- incubação por duas horas e depois foram 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.

RESULTADOS

Os extratos puros e os géis da aroeira-da-praia e aroeira vermelha revelaram efetividade contra *S. aureus* e *E. faecalis*. O extrato puro e gel da pariparoba demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. O extrato da própolis revelou efetividade contra *E. coli* e *St. pyogenes*. As pastas de Ca(OH)₂ revelaram efetividade contra quase todos os micro-organismos testados, com exceção do *St. pyogenes* que foi inibido somente pelas pastas de clorexidina 1% e 2% . A pasta cujo veículo foi o óleo de alho não teve ação. Os bioprodutos não potencializaram a ação das pastas de Ca(OH)₂.

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioprodutos frente a linhagens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

DISCUSSÃO

A clorexidina, tanto a 1% como a 2%, mostrou grande atividade antibacteriana pura, na forma de gel e associada como veículo ao Ca(OH)_2 . Estes resultados corroboram alguns achados da literatura (EVANS *et al.*, 2003; SIRÉN *et al.*, 2004, SOUZA-FILHO *et al.*, 2008). Os halos de inibição mostraram-se menores quando avaliamos a associação da clorexidina ao Ca(OH)_2 , resultados estes que também são pertinentes à literatura encontrada (SCHÄFER; BÖSSMANN, 2004).

Os extratos puros de guaçatonga, bardana, pariparoba e própolis revelaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus pyogenes*, sendo que a bardana mostrou o menor halo de inibição. Em se tratando de ser uma bactéria Gram positiva e, portanto, apresentando grande quantidade de peptidoglicano em nível de parede celular, estes resultados são semelhantes aos de Pereira *et al.*, 2005, que demonstraram atividade antibacteriana da bardana frente ao *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e Gentil *et al.*, 2006 que revelaram atividade do mesmo vegetal frente ao *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans*. Na forma de gel, somente os extratos da própolis e da pariparoba demonstraram atividade contra o *St. pyogenes*, com halos de inibição menores em relação aos extratos puros. Isto pode ter ocorrido devido à menor concentração dos extratos incorporada ao gel (gel a 10%).

As duas linhagens ATCC de *E. faecalis*, ATCC 29212 e ATCC 19433, foram inibidas pelos extratos puros e na forma de gel da aroeira-da-praia e aroeira vermelha, sendo os menores halos na forma de gel. Estes resultados também foram revelados por Costa *et al.*, 2010, utilizando a linhagem ATCC 29212 para os extratos de aroeira-da-praia e aroeira-do-sertão.

CONCLUSÃO

Assim, na presente pesquisa, focada ao emprego de produtos naturais na terapia endodôntica, não pudemos revelar a potencialização das pastas de Ca(OH)_2 pelos bioprodutos puros, que revelaram atividade antibacteriana contra algumas das linhagens estudadas. Também, fica evidente que, com exceção do óleo de alho, as substâncias não interferiram drasticamente com a liberação dos íons cálcio, conforme já demonstrado na literatura (DUARTE *et al.*, 2009) sendo que todas as pastas demonstraram atividade antibacteriana.

Futuras pesquisas, com diferentes metodologias, são necessárias para elucidar um bioproduto que possa efetivamente potencializar a pasta de Ca(OH)_2 em sua atividade antibacteriana na prática endodôntica.

REFERÊNCIAS

COSTA, E. M. M et al. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

DUARTE, M. A. H. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. **J. Endod.**, New York, v. 35, n. 9, p. 1274-1277, 2009.

ESTRELA, C. et al. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 34, p. 341-345, 2001.

ESTRELA, C.; PESCE, H. F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 41-46, 1995.

EVANS, M. D. et al. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J. Endod.**, New York, v. 29, n. 5, p. 338-339, 2003.

GENTIL, M. et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressing. **Phytother. Res.**, London, v. 20, p. 184-186, 2006.

PEREIRA, J. V. et al. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 192-196, 2005.

SCHÄFER, E.; BÖSSMANN, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, New York, v. 31, n. 1, p. 53-56, 2004.

SIQUEIRA Jr., J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 32, p. 361-369, 1999.

SIRÉN, E. K. et al. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 112, p. 326-331, 2004

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à linhagens gram positivas e gram negativas. **SALUSVITA**, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

GREATTI, Vanessa Raquel *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioprodutos frente a linhagens gram positivas e gram negativas. *SALUSVITA*, Bauru, v. 32, n. 3, p. 297-305, 2013.

SOUZA-FILHO, F. J. de et al. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 1, p. 28-33, 2008.