

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO A DIFERENTES VEÍCULOS EM BLOCOS DE DENTINA CONTAMINADOS POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Evaluation of the antibacterial activity of calcium hydroxide associated different vehicles in dentin blocks contaminated with Enterococcus faecalis

Caio Marinho Mello¹

Rafaela Pignatti de Freitas²

Agostinho Coleman Neto²

Caroline de Matos Lourenço²

Rodrigo Ricci Vivan³

Marco Antonio Hungaro Duarte³

Vanessa Raquel Greatti⁴

Paulo Henrique Weckwerth²

¹ Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP

² Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP

³ Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP

⁴ Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP

MELLO, Caio Marinho *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos em blocos de dentina contaminados por *enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 2, p. 161-175, 2016.

RESUMO

Introdução: A infecção endodôntica ocasionada por *Enterococcus faecalis* é um problema sério no tratamento de dentes com-

Recebido em: 29/02/2016

Aceito em: 23/05/2016

prometidos. É de preocupação do cirurgião dentista um completo saneamento do sistema de canais radiculares pela aplicação de medicação antisséptica entre sessões. Dentre estas medicações, a pasta de hidróxido de cálcio tem sido associada a diferentes veículos para potencializar sua ação. **Objetivos:** Diante disto, este estudo objetivou avaliar e comparar a eficiência da atividade antimicrobiana in vitro de diferentes pastas de hidróxido de cálcio frente ao *E. faecalis*. **Material e Métodos:** Os testes foram executados em 49 blocos de dentina infectados com *E. faecalis* e tratados com pastas de hidróxido de cálcio em diferentes veículos por uma semana. A eficiência das pastas foi avaliada pela microscopia confocal de varredura a laser. Para comparação entre as pastas foi empregado o teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn para comparações individuais com nível de significância estabelecido em 5%. **Resultados:** A aplicação das diferentes pastas proporcionou uma significativa alteração na proporção de bactérias viáveis e não viáveis encontradas no biovolume celular total dos blocos de dentina. **Conclusão:** A pasta que revelou melhor desempenho antimicrobiano foi aquela cujo veículo foi água destilada. A pasta de hidróxido de cálcio associada ao extrato propilenoglicólico de guaçatonga não apresentou desempenho antimicrobiano sobre células de *E. faecalis*.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, microbiologia oral, endodontia, hidróxido de cálcio, *Casearia sylvestris*.

ABSTRACT

Introduction: The endodontic infection caused by *Enterococcus faecalis* is a serious problem in the treatment of compromised teeth. It is a concern to the dental surgeon a complete sanitation of the root canal system by applying antiseptic medication between sessions. Among these medications, the calcium hydroxide paste has been linked to different vehicles to enhance its action. **Objectives:** Thus, this study aimed to evaluate and compare the efficiency of in vitro antimicrobial activity of different pastes of calcium hydroxide against *E. faecalis*. **Material and Methods:** Tests were performed in 49 blocks dentin infected with *E. faecalis* and treated with calcium hydroxide pastes in different vehicles for a week. The efficiency of the pastes was evaluated by confocal laser scanning. The Kruskal-Wallis test was used to compare the pastes and the Dunn test was used for individual comparisons with a significance level set at 5%. **Results:** The application of different pastes provided a significant

MELLO, Caio Marinho et al. Avaliação da atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos em blocos de dentina contaminados por *enterococcus faecalis*. SALUSVITA, Bauru, v. 35, n. 2, p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
atividade antibacteriana
do hidróxido de cálcio
associado a diferentes
veículos em blocos de
dentina contaminados
por *enterococcus*
faecalis. SALUSVITA,
Bauru, v. 35, n. 2,
p. 161-175, 2016.

change in the proportion of viable and non-viable bacteria found in the total cell biovolume of the blocks of dentin. Conclusion: The paste that revealed the best antimicrobial performance was the one whose vehicle was distilled water. The calcium hydroxide paste associated with the extract of guaçatonga in propylene glycol showed no antimicrobial performance on cells of E. faecalis.

Keywords: *Enterococcus faecalis, oral microbiology, endodontics, calcium hydroxide, Casearia sylvestris.*

INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas da endodontia é a capacidade do micro-organismo *Enterococcus faecalis* de se infiltrar nos túbulos dentinários, dificultando sua erradicação, sendo a principal causa do insucesso no tratamento endodôntico (LIN; MICKEL; CHOGLE, 2003; GOMES, 2008; ROÇAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004).

Devido à grande resistência do *E. faecalis* a vários medicamentos, muitos pesquisadores estão buscando novas estratégias para a solução dos problemas endodônticos causados por esta bactéria.

Dentre uma gama de medicações intracanaís utilizadas, o hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ é o mais utilizado atualmente pela sua bem documentada atividade antimicrobiana contra a maioria das cepas isoladas do interior de canal radicular (LAW; MESSER, 2004). Porém, o *E. faecalis* ainda está entre os poucos micro-organismos que apresentam resistência ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por causa de uma bomba de prótons que permite a homeostase citoplasmática, mesmo em ambientes extremamente alcalinos (EVANS, 2002; CHÁVEZ, 2007).

A ação antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ está relacionada à liberação de íons hidroxila, que são radicais livres altamente oxidantes que reagem com inúmeras biomoléculas, com consequente aumento do pH, atingindo valores de 11,0-12,5 (ESTRELA *et al.*, 1998). O efeito letal dos íons hidroxila contra células bacterianas é principalmente devido ao dano causado em sua membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas e danos diretos ao DNA (SIQUEIRA-JÚNIOR; LOPES, 1999). Já foi constatada a sobrevivência de cepas de *E. faecalis* em ambientes com pH acima de 10,5-11,0 sendo que os valores de pH têm que ser superiores a 11,5 para se conseguir matar esse micro-organismo (MCHUGH *et al.*, 2004).

Com o intuito de melhorar a ação antibacteriana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ frente ao *E. faecalis*, muitos estudos estão adicionando diferentes veículos às pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para potencializar seus efeitos. Den-

tre eles, a clorexidina tem sido bastante utilizada por seu caráter antisséptico e por apresentar bons resultados contra o *E. faecalis* (GOMES *et al.*, 2003). Outra alternativa que está sendo utilizada contra diversos micro-organismos são os extratos vegetais (DE CASTILHO *et al.*, 2014).

A técnica de contato direto *in vitro*, demonstrou que a associação do hidróxido de cálcio com os veículos clorexidina a 1% em propilenoglicol, propilenoglicol puro e extrato de *Casearia sylvestris* (guaçatonga) em propilenoglicol foi capaz de inibir as cepas de *E. faecalis*, mostrando uma grande eficácia antibacteriana, e apresentaram pH de 12,67; 12,62 e 12,60 respectivamente (WECKWERTH *et al.*, 2011).

Outro estudo mostrou que a associação do Ca(OH)_2 com a clorexidina a 1% apresentou grande eficácia frente ao *E. faecalis* pelo método de difusão sobre ágar Mueller-Hinton (GREATTI *et al.*, 2013).

A adição de vários veículos ao Ca(OH)_2 não altera os valores do pH (PACIOS, 2004; YÜCEL, 2007). Entretanto, os valores do pH podem não aumentar tanto no interior dos túbulos dentinários (ESTRELA *et al.*, 1995).

O objetivo do presente estudo é testar e comparar a associação do Ca(OH)_2 com os veículos clorexidina a 1%, clorexidina a 1% em propilenoglicol, propilenoglicol puro e extrato propilenoglicólico de guaçatonga, frente ao biofilme de *E. faecalis* em blocos de dentina, utilizando microscopia confocal de varredura a laser para avaliação.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos corpos de prova da dentina bovina

Os procedimentos experimentais utilizaram 49 blocos de dentina de incisivos bovinos esterilizados em autoclave e seccionados utilizando uma máquina metalográfica de corte tipo ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, Lake Bluff IL, USA) até alcançar as medidas desejadas (4mm x 4mm x 2mm). Após o corte, os blocos foram lixados utilizando uma máquina polítris.

Os contínuos segmentos de dentina foram tratados com hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos e EDTA a 17% por 5 minutos para a eliminação de resíduos orgânicos e possível presença de “smear layer”.

Para verificar o método de limpeza, três blocos foram observados utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura. Os blocos foram esterilizados com o auxílio de autoclave a 121°C e, uma vez

MELLO, Caio Marinho *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos em blocos de dentina contaminados por *enterococcus faecalis*. SALUSVITA, Bauru, v. 35, n. 2, p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
atividade antibacteriana
do hidróxido de cálcio
associado a diferentes
veículos em blocos de
dentina contaminados
por *enterococcus*
faecalis. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 35, n. 2,
p. 161-175, 2016.

estéreis, foram contaminados com cultura de *Enterococcus faecalis* em BHI por 21 dias.

Contaminação das amostras de dentina

Para a indução do biofilme os 42 blocos de dentina foram distribuídos em placas de cultura celular contendo 24 poços cada. Em seguida, foram submersos em caldo BHI estéril adicionado do inóculo de *E. faecalis* ATCC 25912 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) padronizada pela escala 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ bactérias mL⁻¹). As placas foram colocadas em uma estufa bacteriológica a 36°C por 21 dias.

Durante esse período, a cada 3 dias os corpos de prova foram removidos para um caldo de cultura novo de *E. faecalis* obtido por incubação “overnight” e padronizado até turvação padrão referente à escala 0,5 de Mac Farland. A viabilidade da cultura foi testada a cada 3 dias por inoculação em placas de M-Enterococcus ágar (Difco®) a 36°C por 18 a 24 horas.

Os outros 7 blocos restantes foram mergulhados em caldo BHI (Difco®) estéril por 21 dias, para servirem de controle negativo. Para se confirmar a esterilidade dos blocos, a cada 3 dias, o caldo BHI foi semeado sobre a superfície de placas de ágar Brucela-sangue (Difco®) a 5%.

Ao final do período de formação do biofilme, todos os blocos foram removidos dos caldos de cultura, enxaguados por 3 vezes com solução salina tamponada estéril, secados por aspiração com uma agulha estéril e distribuídos randomicamente sobre a superfície de placas de Petri estéreis de acordo com cada grupo de testes, como se segue: grupo 1: controle negativo (sem infecção e sem medicação); grupo 2: pasta de hidróxido de cálcio com água destilada; grupo 3: pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1%; grupo 4: pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1% em propilenoglicol; grupo 5: pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol puro; grupo 6: pasta de hidróxido de cálcio com extrato propilenoglicólico de guaiatonga (*Casearia sylvestris* Sw.); grupo 7: controle positivo (com infecção e sem medicação).

Os blocos dos grupos 2 a 6 tiveram sua superfície preenchida com as respectivas pastas de hidróxido de cálcio com seus diferentes veículos e foram incubados novamente a 36°C por 7 dias, observando-se umidade de 100% obtida por câmara úmida com algodão embebido em água estéril.

Após o período de 7 dias, os blocos foram removidos da câmara úmida e as pastas removidas pela irrigação de 2 ml de água estéril, sendo em seguida secados com uma agulha estéril e cones de papel estéreis.

Avaliação do desempenho antimicrobiano das diferentes pastas por microscopia confocal de varredura a laser

Os espécimes foram colocados em placas de Petri e coradas com 100 µL da solução Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, EUA), gotejada sobre a dentina. Após a aplicação dos corantes, a placa foi fechada e envolta em papel laminado, com objetivo de realizar a difusão dos corantes no espécime com ausência de luz e em temperatura de 37°C por 20 minutos, de acordo com as orientações do fabricante. 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 observados utilizando a microscopia confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) em aumento de 40X. Seis espécimes foram fotografados em cada grupo e foram tiradas 4 fotos por espécime, totalizando 24 fotos por grupo.

Análise dos dados

Obtidos os dados, os mesmos foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste Kruskal-Wallis para comparação global entre as pastas, com nível de significância de 5% e o teste de Dunn para comparações individuais entre os grupos.

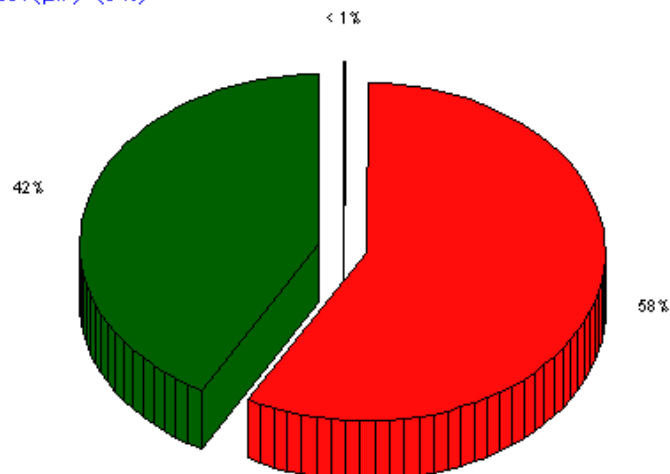
RESULTADOS

A aplicação das diferentes pastas proporcionou uma significativa alteração na proporção de bactérias viáveis e não viáveis encontradas no biovolume celular total dos blocos de dentina (figura 1 a 5). Para isso, contamos com a importância de se analisar a média, mediana e variação de valores nas contagens de células totais e viáveis nos diferentes grupos experimentais (tabela 1).

MELLO, Caio Marinho *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos em blocos de dentina contaminados por *enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 2, p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
atividade antibacteriana
do hidróxido de cálcio
associado a diferentes
veículos em blocos de
dentina contaminados
por *enterococcus*
faecalis. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 35, n. 2,
p. 161-175, 2016.

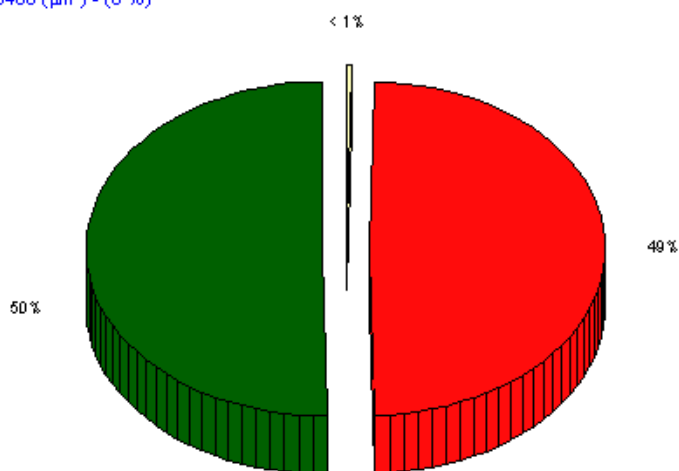
Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 7200439 (μm^3)
Green : 3007566 (μm^3) - (42 %)
Red : 4177279 (μm^3) - (58 %)
NS : 15594 (μm^3) - (0 %)



bioImageL (TM) v.2 (2010)

Figura 1 - Gráfico representativo da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + clorexidina a 1%.

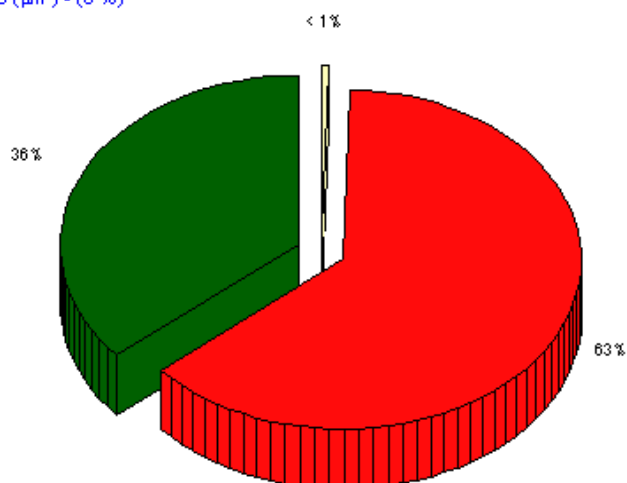
Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 19303044 (μm^3)
Green : 9728884 (μm^3) - (50 %)
Red : 9508754 (μm^3) - (49 %)
NS : 65406 (μm^3) - (0 %)



bioImageL (TM) v.2 (2010)

Figura 2 - Gráfico representativo da contagem de células bacterianas vivas (verdes) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + clorexidina a 1% em propilenoglicol.

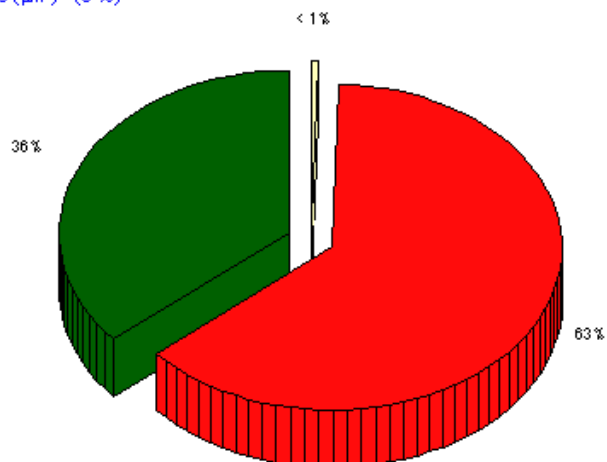
Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 2434403 (μm^3)
 Green : 882867 (μm^3) - (36 %)
 Red : 1540278 (μm^3) - (63 %)
 NS : 11258 (μm^3) - (0 %)



bioImage L (TM) v.2 (2010)

Figura 3 - Gráfico representativo da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + guaçatonga.

Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 2434403 (μm^3)
 Green : 882867 (μm^3) - (36 %)
 Red : 1540278 (μm^3) - (63 %)
 NS : 11258 (μm^3) - (0 %)



bioImage L (TM) v.2 (2010)

Figura 4 - Gráfico representativo da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + propilenoglicol.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
 atividade antibacteriana
 do hidróxido de cálcio
 associado a diferentes
 veículos em blocos de
 dentina contaminados
 por *enterococcus*
faecalis. *SALUSVITA*,
 Bauru, v. 35, n. 2,
 p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
 et al. Avaliação da
 atividade antibacteriana
 do hidróxido de cálcio
 associado a diferentes
 veículos em blocos de
 dentina contaminados
 por *enterococcus*
faecalis. SALUSVITA,
 Bauru, v. 35, n. 2,
 p. 161-175, 2016.

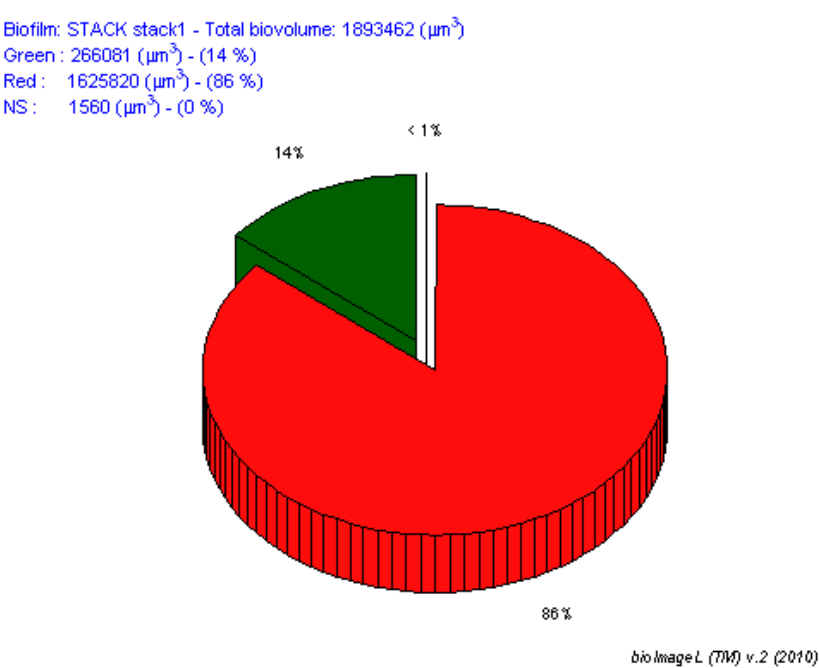


Figura 5 - Gráfico representativo da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + água.

Tabela 1 - Mediana, média e variação de valores do biovolume total e de células vivas após o contato com as substâncias experimentais.

Biovolume Total (µm³)	CaOH +Clorex	CaOH+Clorex +Prop	CaOH +Guaçat	CaOH +Prop	CaOH +Água	Controle Positivo
Mediana	1.04 x 10 ⁴	2.07 x 10 ⁵	1.64 x 10 ⁶	2.54 x 10 ⁵	7.97 x 10 ⁴	9.82 x 10 ⁴
Média	3.16 x 10 ⁴	6.00 x 10 ⁵	1.60 x 10 ⁶	2.13 x 10 ⁵	1.57 x 10 ⁵	2.35 x 10 ⁵
Variação	2.07 x 10 ³ –	1.99 x 10 ⁴ –	5.32 x 10 ⁴ –	1.87 x 10 ⁴ –	2.17 x 10 ⁴ –	1.82 x 10 ⁴ –
	1.45 x 10 ⁵	2.30 x 10 ⁶	3.64 x 10 ⁶	6.19 x 10 ⁵	3.55 x 10 ⁵	7.06 x 10 ⁵
Células vivas (µm³)						
Mediana	3.05 x 10 ³	1.49 x 10 ⁵	3.07 x 10 ⁵	7.42 x 10 ⁴	1.17 x 10 ⁴	8.51 x 10 ⁴
Média	1.14 x 10 ⁴	2.50 x 10 ⁵	8.10 x 10 ⁵	8.86 x 10 ⁴	2.21 x 10 ⁴	1.83 x 10 ⁵
Variação	1.56 x 10 ² –	6.29 x 10 ² –	1.13 x 10 ⁴ –	2.52 x 10 ³ –	5.76 x 10 ⁰ –	1.70 x 10 ⁴ –
	5.65 x 10 ⁴	9.93 x 10 ⁵	2.94 x 10 ⁶	2.57 x 10 ⁵	1.53 x 10 ⁵	5.76 x 10 ⁵

CaOH+Clorex: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1%
 CaOH+Clorex+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1% em propilenoglicol
 CaOH+Guaçat: Pasta de hidróxido de cálcio com extrato propilenoglicólico de guaçatonga
 CaOH+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol puro
 CaOH+Água: Pasta de hidróxido de cálcio com água destilada estéril
 Controle positivo: blocos de dentina infectados sem contato com as substâncias

Os resultados revelaram que 78% das bactérias presentes no grupo controle positivo, ou seja, sem ação de medicamento, eram viáveis (figura 6).

Biofilm: STACK stack 1 - Total biovolume: 2831166 (μm^3)
 Green: 2207469 (μm^3) - (78 %)
 Red: 612403 (μm^3) - (22 %)
 NS: 11294 (μm^3) - (0 %)

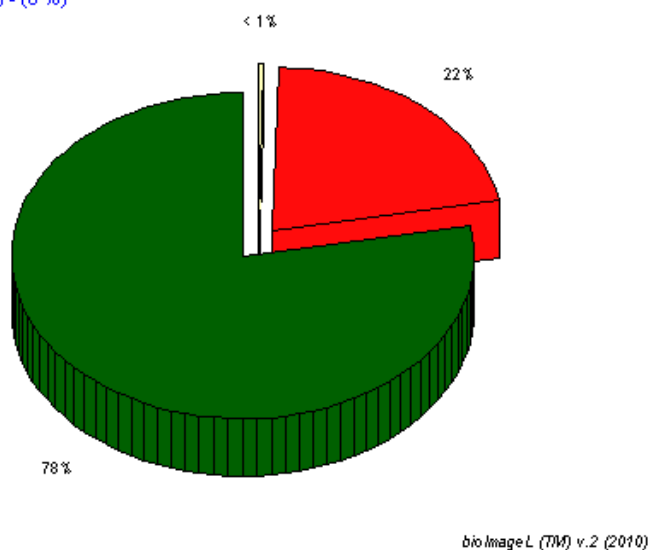


Figura 6 - Gráfico representativo da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo controle positivo.

A comparação estatística dois a dois do desempenho antimicrobiano das diferentes pastas no total de células vivas está representada na tabela 2.

MELLO, Caio Marinho
 et al. Avaliação da
 atividade antibacteriana
 do hidróxido de cálcio
 associado a diferentes
 veículos em blocos de
 dentina contaminados
 por *enterococcus*
faecalis. SALUSVITA,
 Bauru, v. 35, n. 2,
 p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
 atividade antibacteriana
 do hidróxido de cálcio
 associado a diferentes
 veículos em blocos de
 dentina contaminados
 por *enterococcus*
faecalis. *SALUSVITA*,
 Bauru, v. 35, n. 2,
 p. 161-175, 2016.

Tabela 2 - Comparação estatística[#] dois a dois do desempenho antimicrobiano das diferentes pastas no total de células vivas

Pastas	Diferença	Nível de significância
Controle x CaOH+Clorex	30,25	Significante
Controle x CaOH+Clorex+Prop	1,667	Não significativa
Controle x CaOH+Guaç	-7,667	Não significativa
Controle x CaOH+Prop	10	Não significativa
Controle x CaOH+Água	27,57	Significante
CaOH+Clorex x CaOH+Clorex+Prop	-28,58	Significante
CaOH+Clorex x CaOH+Guaç	-37,92	Significante
CaOH+Clorex x CaOH+Prop	-20,25	Não significativa
CaOH+Clorex x CaOH+Água	-2,5	Não significativa
CaOH+Clorex+Prop x CaOH+Guaç	-9,333	Não significativa
CaOH+Clorex+Prop x CaOH+Prop	8,333	Não significativa
CaOH+Clorex+Prop x CaOH+Água	26,08	significante
CaOH+Guaç x CaOH+Prop	17,67	Não significativa
CaOH+Guaç x CaOH+Água	35,42	Significante
CaOH+Prop x CaOH+Água	17,75	Não significativa

CaOH+Clorex: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1%

CaOH+Clorex+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1% em propilenoglicol

CaOH+Guaçat: Pasta de hidróxido de cálcio com extrato propilenoglicólico de guaçatonga

CaOH+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol puro

CaOH+Água: Pasta de hidróxido de cálcio com água destilada estéril

Controle positivo: blocos de dentina infectados sem contato com as substâncias

Valor crítico:33,04

p<0,05

Análise estatística pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparação de significância pelo método de Dunn

DISCUSSÃO

As análises mostraram diferenças no desempenho das pastas de hidróxido de cálcio usadas contra o *E. faecalis* em blocos de dentina quando associadas a diferentes veículos.

Pelo fato do sucesso antimicrobiano do hidróxido de cálcio ser dado pela sua dissociação em íons cálcio e hidroxila mantendo um pH altamente alcalino no interior do canal radicular, 12,5, aproximadamente, no qual a maioria dos micro-organismos não conseguem sobreviver (ESTRELA *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2006), provavelmente o uso de alguns veículos possam influenciar essa mudança de pH mostrando diferentes resultados, sustentando as observações de Fava e Saunders (1999), de que o veículo utilizado com o hidróxido de cálcio pode influenciar a velocidade da dissociação iônica (FAVA; SAUNDERS, 1999).

O uso da pasta com o veículo água destilada demonstrou um melhor desempenho antimicrobiano quando usado no bloco de dentina bovina, em comparação com os outros veículos estudados,

podendo sugerir que a água destilada não atrapalhou na manutenção do pH conferido pelo hidróxido de cálcio neste estudo, possibilitando o seu desempenho. Observações similares foram feitas por Souza-Filho. *et al* (2008). Rached (2010) afirma que os veículos biocompatíveis, como a água destilada, não influenciam na capacidade antibacteriana do hidróxido de cálcio (SOUZA-FILHO *et al.*, 2008; RASHED, 2010).

Em contrapartida, o veículo de extrato propilenoglicólico de guaçatonga apresentou um pior resultado contra o *E. faecalis* presente nos blocos de dentina comparados com os demais veículos. Sabe-se que o tipo de veículo usado depende do efeito clínico que se espera do tratamento, uma vez que o uso de veículo aquoso permite uma rápida liberação iônica, e, por outro lado, com o uso de um veículo viscoso, a liberação iônica fica mais lenta (FAVA; SAUNDERS, 1999). É interessante mencionar que pelo teste do contato direto, nós observamos que a adição de guaçatonga não interferiu com a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio, confirmando que a presença dessa substância não altera o pH da pasta (WECKWERTH *et al.*, 2011). Como o propilenoglicol é um composto orgânico viscoso, é coerente que a associação deste com o hidróxido de cálcio seja menos eficaz em comparação a veículos não viscosos em um mesmo intervalo de tempo na metodologia apresentada no presente trabalho.

Quando o hidróxido de cálcio foi associado com o propilenoglicol puro e com a clorexidina a 1%, os resultados foram semelhantes, porém, muito menor em relação ao veículo água destilada.

Já o veículo clorexidina a 1% em propilenoglicol apresentou um fraco desempenho provavelmente por conta da viscosidade do propilenoglicol, prejudicando a eficiência da clorexidina, que, por se tratar também de uma substância viscosa, necessita de uma concentração maior para ter uma propriedade bactericida, como em uma concentração de 2% (RÖLLA; MELSEN, 1975). Em concentrações mais baixas, como em 0,12%, a clorexidina tem ação bacteriostática, inibindo as funções da membrana, sendo seu efeito mantido por várias horas depois da aplicação devido sua excelente substantividade (efeito residual) (GREENSTEIN *et al.*, 1993).

É importante levar em consideração que, para o hidróxido de cálcio manter a sua capacidade de elevar o pH dentro dos túbulos dentinários, os íons hidroxila devem se difundir por toda a dentina em concentrações elevadas e provocar um aumento drástico nos valores de pH local.

Sendo assim, pode-se observar que as pastas cujos veículos estavam o propilenoglicol não apresentaram eficiência antimicrobiana na metodologia realizada, provavelmente pela lentidão da

MELLO, Caio Marinho *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos em blocos de dentina contaminados por *enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 2, p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
atividade antibacteriana
do hidróxido de cálcio
associado a diferentes
veículos em blocos de
dentina contaminados
por *enterococcus*
faecalis. SALUSVITA,
Bauru, v. 35, n. 2,
p. 161-175, 2016.

capacidade de dissociação dos íons hidroxila do hidróxido de cálcio nestes veículos viscosos no interior dos túbulos dentinários dos blocos de dentina.

CONCLUSÃO

A pasta de hidróxido de cálcio com o veículo água destilada apresentou melhor desempenho antimicrobiano sobre células de *E. faecalis* em blocos de dentina contaminados, enquanto que, com veículo de extrato propilenoglicólico de guaçatonga, apresentou pior desempenho antimicrobiano. Além disso, a associação da pasta com os veículos clorexidina a 1%, clorexidina a 1% em propilenoglicol e propilenoglicol puro não apresentaram desempenho significativo em blocos de dentina contaminados por *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

- CHÁVES DE PAZ, L.E. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **Int Endod J**, Oxford, v.4, n.5, p.344-355, 2007.
- DE CASTILHO, A.L. et al. *In vitro* activity of Amazon plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **Braz J Microbiol**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 769-779, 2014
- ESTRELA, C. et al. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p. 5-9, 1995.
- ESTRELA, C. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J Endod**, New York, v. 2, n. 1, p.15-17, 1998.
- 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.
- EVANS, M. et al. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, Oxford, v.35, n.3, p.221-228, 2002.
- FAVA, L.R.; SAUNDERS, L.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **Int Endod J**, Oxford, v. 32, n.4, p.257-282, 1999.
- GOMES, B.P. et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **Int Endod J**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 267-275, 2003.
- GOMES, B.P. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.102, n.4, p. 544-50, 2006.
- GOMES, B.P. et al. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. **J Endod**, New York, v. 34, p. 4, 2008.
- GREATTI, V.R. 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.
- GREENSTEIN, G.; BERMAN, C.; JAFFIN, R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. **J Periodontol**, Chicago, v.57, n.6, p.
- MELLO, Caio Marinho et al. Avaliação da atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos em blocos de dentina contaminados por *enterococcus faecalis*. **SALUSVITA**, Bauru, v. 35, n. 2, p. 161-175, 2016.

MELLO, Caio Marinho
et al. Avaliação da
atividade antibacteriana
do hidróxido de cálcio
associado a diferentes
veículos em blocos de
dentina contaminados
por *enterococcus*
faecalis. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 35, n. 2,
p. 161-175, 2016.

370-3766, 1986.

LAW, A.; MESSER, H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod*, New York, v.30, n.10, p.689-694, 2004.

LIN, Y. H.; MICKEL, A. K.; CHOGLA, S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, New York, v. 29, n. 9, p. 565-566. 2003.

MCHUGH, P.C. et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*, New York, v. 30, n. 4, p. 218-219, 2004.

PACIOS, M.G. et al. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci*, Tokyo, v. 46, n. 2, p. 107-111, 2004.

ROCAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F., JR.; SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*, New York, v.30, n. 5, p. 315-320, 2004

RÖLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*, Thousand Oaks, v.54, n.3, p.57-62, 1975

RACHED, G.P.A. **Capacidade das substâncias químicas auxiliares em remover**

medicações intracanaís: estudo por MEV. 2010. Dissertação de mestrado- Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Universidade de Campinas, Campinas, 2010.

SIQUEIRA-JÚNIOR, 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, 1999.

SOUZA-FILHO, F.J. 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.

WECKWERTH, P.H. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide associated with different substances against *Enterococcus faecalis* strains. *Dental Press Endod*, apr-june;v.1, n.1, p.46-51, 2011.

YÜCEL, A.Ç. et al. The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, St. Louis, v. 103, n. 5, p. 712-717, 2007.