

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

GABRIELLI MARIM CIRELLI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTA DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ACRESCIDA DE
DICLOFENACO SÓDICO, CIPROFLOXACINA E
ÓLEO DE COCO SOBRE BIOFILME DE *Enterococcus*
*faecalis***

BAURU
2018

GABRIELLI MARIM CIRELLI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTA DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ACRESCIDA DE
DICLOFENACO SÓDICO, CIPROFLOXACINA E
ÓLEO DE COCO SOBRE BIOFILME DE *Enterococcus*
*faecalis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação da Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth.

BAURU
2018

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

C578a	<p>Cirelli, Gabrielli Marim</p> <p>Atividade antibacteriana de pasta de hidróxido de cálcio acrescida de diclofenaco sódico, ciprofloxacina e óleo de coco sobre biofilme de <i>Enterococcus faecalis</i> / Gabrielli Marim Cirelli. -- 2018.</p> <p>31f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Medicação intracanal. 2. Hidróxido de cálcio. 3. Diclofenaco sódico. 4. Ciprofloxacina. 5. Óleo de coco. I. Weckwerth, Paulo Henrique. II. Título.</p>
-------	--

GABRIELLI MARIM CIRELLI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTA DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO ACRESCIDA DE DICLOFENACO SÓDICO,
CIPROFLOXACINA E ÓLEO DE COCO SOBRE BIOFILME DE
*Enterococcus faecalis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação da Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth.

Bauru, 27 de Novembro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Flora Freitas Fernandes Tavora
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva
Universidade do Sagrado Coração

Dedico este trabalho aos meus pais que me apoiaram em todas as decisões e vibraram com cada nova vitória e ao meu professor orientador por toda sua paciência e confiança em mim ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a oportunidade de concluir uma etapa muito importante tanto pessoal quanto profissionalmente, por ter me dado força nas horas de desespero e quando tudo parecia não dar certo.

Ao meu orientador **Professor Doutor Paulo Henrique Weckwerth**, sou extremamente grata pela confiança em mim depositada durante a realização da minha iniciação científica e trabalho de conclusão de curso, por todo aprendizado, por estar sempre disposto quando precisei. Agradeço por toda paciência e carinho que teve comigo ao longo desse um ano.

Aos meus pais **Rui Cesar Cirelli e Elilda Regina Marim Cirelli**, que foram peças fundamentais para que eu pudesse alcançar meu objetivo e concluir essa fase de minha vida, não mediram esforços para que tudo isso se tornasse realidade, me apoiaram em todas as decisões, me deram suporte em todos meus tropeços ao longo desses quatro anos e vibraram com cada nova vitória, cuidaram de cada detalhe para que nada me faltasse e tudo fosse perfeito, me deram ânimo para seguir sempre em frente.

Ao meu namorado e amigo **Victor Henrique Pedraci**, que mesmo com a distância me deu força em todos os momentos de angústia e desespero, vibrou comigo em cada nova conquista e desde o início acreditou na minha capacidade quando nem eu mesma acreditava, agradeço-o de coração, pois foi fundamental para meu desenvolvimento e chegada até aqui.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para meu aprendizado, em especial a **Professora Doutora Flora Freitas Fernandes Távora** que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me aconselhando e acreditando no meu potencial e por aceitar carinhosamente meu convite para ser avaliadora do meu trabalho e ao **Professor Doutor Guilherme Ferreira da Silva**, por todo conhecimento, suporte e confiança nas clínicas, me proporcionando mais segurança nos procedimentos clínicos e também por aceitar meu convite para avaliar meu TCC.

À Universidade do Sagrado Coração que me ofereceu ótimas condições de trabalho em seus laboratórios.

E às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que esse projeto fosse concluído com sucesso. A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO

O hidróxido de cálcio [Ca(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 Ca(OH)₂. A atividade antimicrobiana do Ca(OH)₂ está relacionada à 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 linhagens de microrganismos. O propósito da presente pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana de pastas de Ca(OH)₂ puras e associadas com o anti-inflamatório diclofenaco sódico, o antibiótico ciprofloxacina e o óleo de coco sobre biofilme de *E. faecalis* ATCC 4083 por microscopia confocal de varredura a laser. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis para comparação global, com nível de significância de 5% e o teste de Dunn para comparação individual entre os grupos. Os resultados mostram que a pasta com diclofenaco sódico foi a mais efetiva em eliminar os microrganismos (19,46 % de viabilidade), seguida da pasta com ciprofloxacina (27,02% de viabilidade). A pasta com óleo de coco não mostrou aumento na efetividade frente ao *E. faecalis* quando comparada com a pasta de hidróxido de cálcio pura.

Palavras-chave: Medicação intracanal. Hidróxido de cálcio. Diclofenaco sódico. Ciprofloxacina. Óleo de coco.

ABSTRACT

Calcium hydroxide [Ca(OH)₂] is a white, highly alkaline powder which, in endodontics, has been used in pulpotomies, treatment of root perforations, as a component of sealing cements and as intracanal medication, when used in the latter situation, is associated with a vehicle in order to obtain pulp 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. These hydroxyl ions are highly oxidizing free radicals that react with numerous biomolecules. Despite its wide use, this substance has not demonstrated efficacy on some strains of microorganisms. The purpose of the present study will be to evaluate the in vitro antimicrobial activity of pure Ca(OH)₂ pastes and associated with the anti-inflammatory diclofenac sodium, the antibiotic ciprofloxacin and coconut oil. The efficiency of the same slabs on *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 biofilm will be evaluated by laser scanning confocal microscopy. After data tabulation, the statistical analysis will be performed by ANOVA for global comparison, and Tukey's test for individual comparisons, with significance level of 5%.

Keywords: Intracanal medication. Calcium hydroxide. Sodium diclofenac. Ciprofloxacin. Coconut oil.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	OBJETIVO GERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO PURAS E ASSOCIADAS AOS ANTI- INFLAMATÓRIOS PELO MÉTODO DA MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	18
4.1.1	preparo dos corpos de prova.....	18
4.1.2	contaminação da dentina e tratamento com as pastas de hidróxido de cálcio	18
4.1.3	testes para avaliar a atividade antimicrobiana das diferentes pastas por microscopia confocal de varredura a laser	20
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5	RESULTADOS.....	21
6	DISCUSSÃO.....	22
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

O hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ 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 et al., 1995). Baseado no peso molecular da substância, a porcentagem de íons hidroxila e íons cálcio encontrados no $\text{Ca}(\text{OH})_2$ corresponde a 45,89% e 54,11%, respectivamente (ESTRELA; PESCE, 1996).

Em Endodontia o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 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 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ESTRELA et al., 2001).

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

Recentes estudos mostraram a classificação e indicações clínicas de várias formulações de pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (ESTRELA 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 apontou que bactérias anaeróbias Gram negativas são mais susceptíveis ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em relação aos microrganismos Gram positivos facultativos.

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

Sirén et al. (2004) avaliaram o efeito antibacteriano do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ combinado com clorexidina e com iodo-iodeto de potássio sobre uma linhagem padrão de *E. faecalis*. Os resultados deste estudo revelaram a efetividade na desinfecção de dentina bovina contaminada quando o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi adicionado de clorexidina ou iodo-iodeto de potássio.

Pacios et al. (2004), avaliando a influência de seis diferentes veículos (água destilada, clorexidina, propilenoglicol, solução anestésica, paramonoclorofenol canforado e

paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol) sobre o pH de pastas de Ca(OH)_2 *in vivo* e *in vitro*, revelaram que em ambas condições o pH manteve-se constante durante todas as variáveis de tempo analisadas, sendo que a pasta cujo veículo foi água destilada mostrou-se com pH superior em condição clínica.

Schäfer e Bössmann (2004) compararam a atividade antimicrobiana da clorexidina pura com duas diferentes pastas de Ca(OH)_2 : uma comercial e outra cujo veículo foi clorexidina em proporção igual peso:peso, sobre dentina humana contaminada com *E. faecalis* ATCC 6057. Neste estudo os pesquisadores evidenciaram que clorexidina pura mostrou-se mais eficiente quando comparada a pasta de Ca(OH)_2 com veículo clorexidina na desinfecção da dentina contaminada. Pesquisa semelhante realizada por Ercan et al. (2006) revelou que a clorexidina gel a 2% foi mais efetiva na eliminação de *E. faecalis* e *Candida albicans* quando comparado com as pastas de Ca(OH)_2 com veículo água estéril e clorexidina 2%.

A desinfecção de túbulos dentinários humanos infectados com *E. faecalis* ATCC 29212 por três diferentes pastas de Ca(OH)_2 (veículo água, veículo iodo-iodeto de potássio e pasta Metapex®, esta última contendo iodofórmio e óleo de silicone) foi avaliada por Cwikla et al. (2004). Este estudo demonstrou que a pasta Metapex® revelou melhor atividade antibacteriana quando comparado às outras pastas.

A avaliação *in vitro* da susceptibilidade de patógenos endodônticos a pastas de Ca(OH)_2 combinadas com diferentes veículos foi demonstrada por Vianna et al. (2005). Neste estudo as pastas foram preparadas com os veículos: água estéril, glicerina, paramonoclorofenol canforado, paramonoclorofenol canforado + glicerina, polietilenoglicol e paramonoclorofenol canforado + polietilenoglicol. Bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas foram mais resistentes ao Ca(OH)_2 e o tempo necessário para a eliminação dos microrganismos variou de 4 a 24 horas. Bactérias anaeróbias foram eliminadas dentro de 5 minutos ou menos. *E. faecalis* e *C. albicans* foram os microrganismos mais resistentes frente as pastas utilizadas.

Avaliando a influência do iodofórmio no potencial antimicrobiano de pastas de Ca(OH)_2 , Estrela et al. (2006), revelaram que as pastas com solução salina e com iodofórmio e salina mostraram significativa atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans* pelos métodos do contato direto e difusão da substância sobre placas de ágar.

Objetivando avaliar a atividade antibacteriana residual de várias pastas de Ca(OH)_2 após permanecerem 21 dias em canais radiculares de cães com lesões periapicais, Soares et al. (2007) utilizaram o método da difusão sobre placas de ágar Mueller-Hinton contaminadas

com *Micrococcus luteus* ATCC 9341 a partir das pastas de Ca(OH)_2 com veículo solução anestésica e clorexidina a 2% e as pastas Calen® e Calen® + paramonoclorofenol canforado. A pasta de melhor atividade antibacteriana residual foi aquela cujo veículo foi digluconato de clorexidina a 2%.

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana de duas pastas de hidróxido de cálcio associadas a extrato etanólico e não etanólico de própolis, Rezende et al. (2008) submetem culturas polimicrobianas de molares decíduos necrosados ao teste de difusão sobre placas de ágar cérebro e coração em atmosfera anaeróbica. Ambas pastas apresentaram zonas de inibição maiores quando comparadas ao grupo controle com pasta de veículo propilenoglicol.

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 Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2%, Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2% + iodofórmio, Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2% + óxido de zinco e Ca(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.

Silveira et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta de Ca(OH)_2 combinada com clorexidina e outras substâncias contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *St. mutans*. Os autores utilizaram pastas de Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2%, Ca(OH)_2 + paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol, Ca(OH)_2 + propilenoglicol e Ca(OH)_2 + solução salina. Utilizaram o teste de diluição em caldo de cultura e quantificaram o tempo necessário para as pastas inibirem o crescimento bacteriano. Os resultados revelaram que as pastas de Ca(OH)_2 + paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol e Ca(OH)_2 + propilenoglicol eliminaram todas as células bacterianas em 15 segundos. A pasta de Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2% necessitou de 45 segundos para eliminar *S. aureus* e *E. faecalis*. A pasta de Ca(OH)_2 + solução salina necessitou de 45 segundos para eliminar *E. faecalis*. Assim, pode-se concluir que *E. faecalis* foi a bactéria mais resistente, seguido pelo *S. aureus*.

A susceptibilidade do *E. faecalis* frente a pasta de Ca(OH)_2 e aos antibióticos amoxicilina + clavulanato de potássio, ciprofloxacina, clindamicina e doxiciclina foi avaliada *in vitro* em dentes humanos por Saber et al. (2012). Dentes pré-molares mandibulares humanos foram instrumentados, autoclavados e contaminados com um isolado clínico de *E. faecalis* para que houvesse a formação de biofilme, revelado por microscopia eletrônica de

varredura nos intervalos de três, dez, vinte e trinta dias. Os medicamentos foram preparados pela concentração inibitória mínima para *E. faecalis* na forma de pastas e introduzidos nos canais infectados. Após uma semana, cones absorventes foram utilizados para coleta dos espécimes e contagem através de cultura bacteriológica. Os resultados revelaram que nenhum dos antibióticos e nem a pasta de Ca(OH)_2 foram eficazes na eliminação do biofilme. Porém, todos os antibióticos foram mais eficazes na redução do número de Unidades Formadoras de Colônias quando comparados a pasta de Ca(OH)_2 . O efeito antimicrobiano da amoxicilina + clavulanato de potássio, ciprofloxacina e clindamicina foi estatisticamente melhor em relação ao efeito da doxiciclina.

Outros estudos comparando a atividade do Ca(OH)_2 com antibióticos são encontrados na literatura, como o estudo de Pavaskar et al. (2012), onde os pesquisadores compararam a efetividade da linezolida em relação ao Ca(OH)_2 . Num estudo *in vitro* utilizando dentes humanos, pré-molares, instrumentados e contaminados com células planctônicas de *E. faecalis* ATCC 29212, os pesquisadores revelaram que após o tratamento dos espécimes por três, oito e 14 dias com Ca(OH)_2 , Vitapex®, linezolida e Ca(OH)_2 + linezolida, somente linezolida mostrou-se eficaz na eliminação do *E. faecalis*, seguida pela associação de Ca(OH)_2 + linezolida.

A atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 se dá pela liberação de íons hidroxila e consequente aumento de pH, podendo atingir valores de 11 a 12,5 (ESTRELA et al., 1998). Os efeitos letais desses íons hidroxila sobre as células bacterianas devem-se, principalmente, aos danos ocasionados na membrana citoplasmática, a desnaturação de proteínas e danos diretos ao DNA (SIQUEIRA et al., 1999). Esta atividade também é resultante da presença de cálcio que remove gás carbônico, fonte respiratória de bactérias anaeróbias (KONTAKIOTIS et al., 1995). Outro importante fator está no fato do Ca(OH)_2 inibir o lipopolissacarídeo, componente agressor presente na membrana externa da parede de bactérias Gram negativas (NICHOLS, SAFAVI, 1993; NICHOLS, SAFAVI, 1994; TANOMARU et al., 2003).

Para ser efetivo contra bactérias localizadas dentro do túbulo dentinário, os íons hidroxila do Ca(OH)_2 devem difundir-se na dentina em concentrações suficientes para sobrepujar seu efeito tampão e, consequentemente, aumentar drasticamente o pH local.

As pastas de Ca(OH)_2 em diferentes veículos e concentrações tem sido o material de escolha como medicação intracanal por seu alto poder alcalinizante criando um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano.

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*

O *E. faecalis* é um coco Gram positivo presente principalmente em casos de insucesso endodôntico que tem mostrado elevada resistência ao Ca(OH)_2 (ROÇAS et al., 2004; SUNDQVIST et al., 1998).

Seus fatores de virulência têm sido amplamente estudados. 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 (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004).

O ácido lipoteicóico é, além de adesina, um importante fator de virulência por induzir fator de necrose tumoral (TNF), modulando de forma agressiva a resposta imune. Produzem várias enzimas extracelulares como gelatinase e hialuronidase (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004).

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

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 (EVANS et al., 2002; WEIGER et al., 1995).

McHugh et al. (2004) avaliaram o pH necessário para matar *E. faecalis* ATCC 29212 *in vitro* e concluíram que, entre pH 10,5 até 11,0 pode ocorrer retardo no crescimento do microrganismo e somente em pH 11,5 ou superior ocorre a morte.

Evans et al. (2002) verificaram que a resistência desse microrganismo ao Ca(OH)_2 está relacionada a uma bomba de prótons.

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.

Dastidar et al. (2000) demonstraram que o diclofenaco de sódio tem uma ação altamente bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram negativas pela inibição da síntese de DNA bacteriana. Utilizaram uma linhagem *E. coli* K12 C600 e *S. aureus* NCTC 6571 para o experimento. Os pesquisadores avaliaram o efeito bacteriostático e bactericida da

droga sob quatro variáveis de tempo. 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 UFC de $2,2 \times 10^8$ inicialmente (2 horas), chegando a zero na variável de 18 h.

Dutta et al. (2007) realizaram um estudo com uma variedade de métodos para demonstrar a atividade antibacteriana do diclofenaco de sódio. Em um modelo experimental com ratos, a droga foi testada com o objetivo de promover proteção contra infecção virulenta por *Salmonella*. Em um teste de sinergismo, utilizando o método de difusão em disco de papel, verificaram a possibilidade de associação de diclofenaco de sódio 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.

Os efeitos antibacterianos do diclofenaco sódico, ibuprofeno, amoxicilina e pasta de hidróxido de cálcio foram avaliados de forma comparativa por Salem-Milani et al. (2013), contra linhagem de *E. faecalis* ATCC 29212. Os pesquisadores utilizaram gentamicina como controle positivo dos testes. Os métodos utilizados foram o da difusão das drogas sobre ágar e o da concentração inibitória mínima. Utilizando o método da difusão em ágar o estudo revelou que o hidróxido de cálcio apresentou halos de inibição de 1,0 mm, o diclofenaco sódico 9,1 mm e o ibuprofeno 12,9 mm, a amoxicilina 20,67 mm e o controle positivo (gentamicina), 15,7 mm. O diclofenaco sódico e o ibuprofeno revelaram concentração inibitória mínima de 50 µg/mL para a bactéria em estudo. Os autores puderam concluir que as drogas anti-inflamatórias apresentaram pronunciada atividade antibacteriana contra *E. faecalis* em comparação a pasta de hidróxido de cálcio.

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

Mais recentemente, foi demonstrado que a associação de diclofenaco sódico, ibuprofeno e ciprofloxacina à uma pasta de hidróxido de cálcio não altera o pH e aumenta a ação antimicrobiana deste medicamento sobre biofilme de *E. faecalis*. Além disso, os autores atestam que estes AINES misturados à pasta podem atuar topicamente sobre os tecidos apicais no controle da inflamação, reduzindo a dor pós-operatória (FREITAS et al., 2017).

Uma substância de grande destaque atual é o óleo de coco, uma gordura que é um alimento com poderes antimicrobianos, imunomodulador, antioxidante, termogênico,

insulínótropico, antiaterogênico, neuroestimulador, modulador de peso, regulador da dislipidemia sanguínea e além desses, possui muitos outros efeitos que fazem bem para a saúde humana (ARUNIMA, 2012; BABA, 1982; CARDOSO, 2015; GARFINKEL et al., 1992; KABBARA, 1972; LINDEBERG et al., 1999; MARINA et al. 2008; NAIR et al. 2015; RAJAMOCHAN, 2012).

Muito conhecido por ser um alimento funcional, alguns estudos mostram seu poder antimicrobiano e antifúngico. Dentro da atividade antimicrobiana, o óleo de coco se destaca por ser antibacteriano, antiparasitário, antiviral e antifúngico (BERGSSON et al., 2001; KABBARA, 1972; THORMAR et al., 1978).

Para entender melhor estas grandes propriedades, é importante dizer que o coco é um alimento com predomínio de gordura composta por ácidos graxos saturados (92%), além de ácidos graxos mono e poliinsaturados, fibras, proteínas, vitaminas, água, minerais e pouco carboidrato (BANZON, 1996; GRIMWOOD, 1975; GUARTE, 1996; KELLERT, 1996; MUHLBAUER, VELASCO, 1982).

Tanto os macronutrientes quanto os micronutrientes presentes no coco são os responsáveis pelos grandes benefícios oferecidos por esse alimento funcional. Dividimos as gorduras saturadas do coco em ácidos graxos de cadeia curta (até 6 carbonos), média (de 8 a 12 carbonos) e longa (acima de 14 carbonos). Sendo assim, temos o ácido caprílico (cadeia curta), os ácidos caprílico, cáprico, e láurico (cadeia média) e os ácidos esteárico, mirístico e palmítico (cadeia longa). Vale mencionar que o metabolismo do ácido graxo difere quanto ao tamanho de sua cadeia de carbono, por isso não é certo falar que todas as gorduras se comportam de maneira igual no organismo (BABAYAN, 1987). Os ácidos graxos de cadeia média do coco (64%) vão direto para o fígado através da veia porta para servirem de energia, não sendo depositados em adipócitos, como os de cadeia longa, sendo assim, incapazes de promover ganho de peso (BABA et al., 1981; BABAYAN, BACH, 1982; KAUNITZ, 1971).

Os efeitos antimicrobianos dos lipídios têm sido extensivamente estudados ultimamente (BERGSSON, et al., 1998; ISAACS et al., 1995; KABARA, 1978; SHIBASAKI, 1978). Alguns microorganismos inibidos pelos poderes do óleo de coco são: *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Giardia lamblia*, *HIV*, *Herpes simplex*, *citomegalovirus*, *virus Epstein Barr*, *Influenza*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria* e *Candida albicans* (BERGSSON, 2002; ENIG, 1998; KABARA, 1972; OGBOLU, 2007; PEEDIKAYIL et al., 2016; STEINGRIMSSON, 2002; THORMAR et al., 1999; THORMAR, 2002).

Para a propriedade antimicrobiana, o ácido láurico - 47% (12 carbonos) e o ácido cáprico - 7% (10 carbonos) se destacam. Esses ácidos graxos, após ingeridos na forma de triacilglicerol, são quebrados no trato gastrointestinal por lipases formando os monoacilgliceróis monolaurina e monocaprina, respectivamente. Diante disto, é importante ressaltar que a monolaurina e a monocaprina são excelentes antifúngicos naturais (BERGSSON, 1999; CARPO, 2007; OGBOLU, 2007; VERALLO, 2008).

Em um estudo feito por Ogbolu et al., (2007) por difusão radial, *C. albicans* teve uma maior sensibilidade ao óleo de coco virgem (100%) em comparação ao fluconazol (92%) (OGBOLU et al., 2007). Em um outro estudo, pelo mesmo método, o óleo mostrou uma ação igual ao cetoconazol contra *C. albicans* (SHINO et al., 2016). Usado como enxaguante bucal, o óleo diminuiu placas dentais e gengivite, em estudos in vivo, comparando-se ao uso de clorexedina (KAUSHIK et al., 2016; PEEDIKAYIL et al., 2015; PEEDIKAYI et al., 2016).

Várias hipóteses têm sido discutidas para se entender o mecanismo pelo qual o óleo de coco por si pode agir diminuindo a quantidade microbiana e adesão de placas dentais. O exato mecanismo ainda não está claro. Estudos mostraram que o óleo de coco tem um grande valor de saponificação e emulsão, podendo ser este um dos motivos de sua ação. Os álcalis da saliva também podem reagir com o óleo levando a saponificação (KAUSHIK et al., 2016; PEEDIKAYI et al., 2016).

Em virtude de alguns estudos demonstrarem eficácia antimicrobiana de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e das propriedades antimicrobianas e antifúngicas do óleo de coco seria vantajoso se o hidróxido de cálcio fosse associado a um anti-inflamatório que além de promover ação de antimicrobiana e alívio da dor do paciente e também ao óleo de coco para que não contribuísse para o aparecimento de linhagens resistentes.

Diante da importância do assunto em questão, e dos poucos trabalhos na literatura sobre essas associações, tornou viável e oportuno a realização da presente pesquisa. Diante do exposto, a caracterização da atividade antibacteriana de pastas de hidróxido de cálcio puras e acrescidas de diclofenaco sódico, ciprofloxacina e óleo de coco, constituiu o objetivo do presente estudo.

2 JUSTIFICATIVA

Dor endodôntica é causada por uma inflamação, caracterizada pela liberação de prostaglandinas que promovem a dor, e esta pode durar por vários dias mesmo após o tratamento. Na maioria dos casos são prescritos anti-inflamatórios para o paciente no pré-tratamento e pós-tratamento, como esclarecido por Ramazani et al. (2013), sobre o uso profilático de ibuprofeno no controle da dor. Em virtude de alguns estudos demonstrarem eficácia antimicrobiana de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), seria vantajoso se o hidróxido de cálcio fosse associado a um anti-inflamatório que além de promover ação antimicrobiana e alívio da dor do paciente, não contribuísse para o aparecimento de linhagens resistentes.

O objetivo do presente trabalho é avaliar a eficiência antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio pura e associada com diclofenaco sódico, ciprofloxacina e óleo de coco, sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) 4083, em bloco de dentina por microscopia confocal de varredura a laser.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos nos itens abaixo.

3.1 OBJETIVO GERAL

A presente pesquisa tem como objetivo geral avaliar a atividade antibacteriana de pastas de Ca(OH)_2 associadas com diclofenaco sódico, ciprofloxacina e óleo de coco, sobre a linhagem bacteriana de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a atividade antibacteriana de pastas de hidróxido de cálcio associadas com diclofenaco sódico, ciprofloxacina e óleo de coco sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 em blocos de dentina contaminados, utilizando-se o método da microscopia confocal de varredura a laser.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trechos que seguem apresentam as etapas que foram desenvolvidas no decorrer do projeto.

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO PURAS E ASSOCIADAS AOS ANTI-INFLAMATÓRIOS PELO MÉTODO DA MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

4.1.1 Preparo dos corpos de prova

Os procedimentos experimentais utilizaram 36 blocos de dentina bovina esterilizados. As características dos blocos foram de aproximadamente 4x4x2mm. Os blocos de dentina foram confeccionados a partir 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.

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”. Os blocos foram esterilizados com o auxílio de autoclave a 121°C; uma vez estéreis, os blocos foram contaminados com solução de *Enterococcus faecalis* em BHI por 21 dias.

4.1.2 Contaminação da dentina e tratamento com as pastas de hidróxido de cálcio

Para indução do biofilme sobre os blocos de dentina foi adotada a metodologia recomendada por Guerreiro-Tanomaru et al. (2013). Na formação do biofilme foi empregada uma cepa padrão de *E. faecalis* ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA) 4083. Após confirmação da pureza da cepa, realizada pela coloração de Gram, morfologia da colônia e identificação bioquímica, o micro-organismo foi reativado em 4 mL de caldo BHI estéril e mantido em estufa a 37°C, durante 12 horas. Após este período a densidade óptica do meio foi medida e ajustada em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP,

Brasil) com comprimento de onda de 600 nm. A densidade celular foi de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL⁻¹ (UFC/mL⁻¹). Em duas placas de cultura celular de 24 poços foram colocados os blocos de dentina com uma das superfícies marcadas com lápis e voltada para baixo. Em seguida, os blocos foram submersos com 3,6 mL de caldo BHI estéril adicionado de 0,4 mL do inóculo bacteriano padronizado. As placas foram colocadas em uma estufa bacteriológica a 37°C durante 21 dias. Para que não houvesse deficiência de nutrientes para as células bacterianas, o meio de cultura BHI de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 h, sem a adição de novos micro-organismos.

Ao final deste período, todos os blocos foram removidos dos caldos de cultura, foram enxaguados por 3 vezes com solução salina tamponada estéril, secados 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:

- a) grupo 1: pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol;
- b) grupo 2: pasta de hidróxido de cálcio com diclofenaco sódico;
- c) grupo 3: pasta de hidróxido de cálcio com Ciprofloxacina;
- d) grupo 4: pasta de hidróxido de cálcio com óleo de coco;
- e) grupo 5: controle positivo (com infecção e sem medicação);
- f) grupo 6: controle negativo (sem infecção e sem medicação).

Os blocos dos grupos 1 até 4 tiveram sua superfície preenchida com as respectivas pastas de hidróxido de cálcio com seus diferentes medicamentos. As pastas puras de Ca(OH)₂ foram manipuladas a partir do pó até se obter a consistência de creme dental, utilizando-se como veículo o propilenoglicol. As pastas associadas aos anti-inflamatórios foram proporcionadas com a drogas a 5% do peso total de hidróxido de cálcio, utilizando-se também o veículo propilenoglicol. A pasta de óleo de coco foi manipulada com o próprio óleo até atingir a consistência de um creme dental.

Após o tratamento os blocos foram incubados novamente a 36°C por uma semana, observando-se umidade de 100% obtida por câmara úmida com algodão embebido em água estéril. Após o período de uma semana, os blocos foram removidos da câmara úmida e as pastas foram removidas pela irrigação com 2 mL de água estéril, sendo em seguida secados com uma agulha estéril e cones de papel estéreis.

4.1.3 Testes para avaliar a atividade antimicrobiana das diferentes pastas por microscopia confocal de varredura a laser

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

Todos os espécimes foram examinados sob microscopia confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) em aumento de 40X. Três espécimes foram fotografados em cada grupo e foram tiradas 4 fotos por espécime, totalizando 12 fotos por grupo.

As imagens foram analisadas pelo software bioImage_L para análise estrutural de biofilme formado sobre os blocos de cimento, segundo Chávez de Paz41.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Obtidos os dados, os mesmos foram submetidos à análise estatística, empregando-se o teste Kruskal-Wallis para comparação global, com nível de significância de 5% e o teste de Dunn para comparação individual entre os grupos.

5 RESULTADOS

Para avaliar o desempenho antimicrobiano das diferentes pastas de hidróxido de cálcio sobre blocos de dentina contaminados com *E. faecalis*, ao final de sete dias de ação das pastas, os blocos foram submetidos à análise em microscopia confocal de varredura a laser, a fim de se determinar a diferenciação entre bactérias viáveis e não viáveis.

A Tabela 1 representa a mediana e a variação de valores nas contagens de células totais (biovolume) e viáveis nos diferentes grupos experimentais realizados até o presente momento.

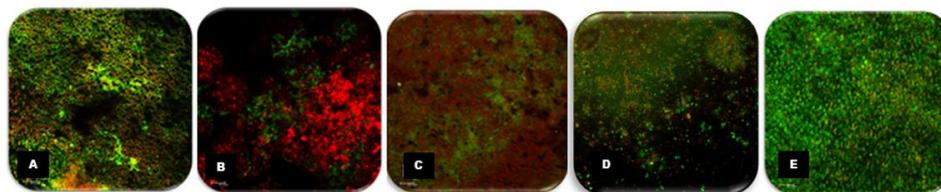
Tabela 1 - Mediana e variação de valores do biovolume total e de células vivas após o contato com as substâncias experimentais.

Grupos	Biovolume (μm^3)	Viabilidade (%)
Ca(OH)₂ + propilenoglicol	20027 (8599-36301)	55.88 (25.77-75.49)
Ca(OH)₂ + diclofenaco sódico	33033 (5975-81114)	19.46 (2.99-44.55)
Ca(OH)₂ + ciprofloxacina	23384 (329-84929)	27.02 (11.63-52.41)
Ca(OH)₂ + óleo de coco	37822 (9677-80325)	60.08 (30.75-83.42)
Controle positivo	90295 (56294-141633)	83.37 (69.55-88.02)
Controle negativo	0	0

Fonte: Elaborado pela autora.

As figuras expostas no Quadro 1, representam uma foto selecionada da microscopia confocal de varredura a laser de cada um dos grupos de teste.

Quadro 1 - Microscopia confocal de varredura a laser.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A (Pasta de hidróxido de cálcio pura); B (Pasta de hidróxido de cálcio com diclofenaco sódico); C (Pasta de hidróxido com ciprofloxacina); D (Pasta de hidróxido de cálcio com óleo de coco); E (Controle Positivo: com infecção e sem medicação).

6 DISCUSSÃO

A adição de substâncias antimicrobianas ao hidróxido de cálcio tem sido proposta com o intuito de potencializar seu efeito antimicrobiano, já que algumas espécies bacterianas encontradas nos canais radiculares se mostram resistentes. (GARCIA et al., 2015; ZANCAN et al., 2016).

Enterococcus faecalis é um coco Gram positivo, frequentemente isolado de casos de fracasso endodôntico (GOMES, PINHEIRO et al., 2008; ROÇAS et al., 2004; SUNDQVIST et al., 1998). Tem a habilidade de resistir a pH elevado (MCHUGH et al., 2004) e a resistência desse microrganismo ao hidróxido de cálcio está relacionada a uma bomba de próton (EVANS et al. 2002). Esta espécie tem habilidade de aderir, colonizar e formar biofilme na superfície dos canais radiculares e cimento, além de ser capaz de aderir na gutapercha ou nos cimentos endodônticos (BASRANI, GEORGE, KISHEN, 2008; LEONARDO et al., 2002 NAIR, 2004). O crescimento em biofilme promove uma proteção para as bactérias, e assim podem resistir aos agentes antimicrobianos usados durante um tratamento endodôntico (DISTEL, GILLESPIE, HATTON, 2002). A capacidade de formação de biofilme tem demonstrado ser um dos maiores fatores de persistência e recolonização após o tratamento endodôntico (DISTEL, GILLESPIE, HATTON, 2002).

O desenvolvimento de biofilmes *in vitro* possibilita estudar detalhadamente sua estrutura e arranjo, o que auxilia nos estudos de substâncias que visam sua eliminação, como soluções irrigadoras, curativos de demora e cimentos endodônticos, pois se sabe que o biofilme bacteriano, apresenta uma maior resistência que bactérias em sua forma planctônica (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2007). A metodologia utilizada no presente estudo, desenvolvida por Guerreiro-Tanomaru (2013), é utilizada para análise da atividade antibiofilme através da microscopia confocal de varredura a laser e similar a utilizada anteriormente por alguns autores (DASTIDAR et al., 2000).

O presente estudo avaliou a sensibilidade do biofilme formado pela linhagem de *E. faecalis* (ATCC 4083), originalmente isolada de infecção do canal radicular, frente às pastas de Ca(OH)_2 . A maioria dos trabalhos utiliza a linhagem de *E. faecalis*, a ATCC 29212. Essa linhagem é isolada de trato urinário e mostra maior resistência aos medicamentos. Zancan et al. (2018) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes pastas endodônticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, isolado do trato urinário, e compararam a ação com *E. faecalis* ATCC 4083, isolado do canal radicular. Os autores mostraram que a ação antimicrobiana dos medicamentos contra cada linhagem foi divergente quanto à ordem de

suscetibilidade e concluíram que as cepas se comportam de maneiras diferentes. Em geral, a cepa isolada do trato urinário foi mais resistente aos medicamentos testados. Os autores sugerem o uso da cepa ATCC 4083 para obter resultados mais próximos da realidade clínica quando *E. faecalis* for utilizado o para pesquisa *in vitro* em endodontia.

Os diferentes veículos e substâncias adicionadas ao hidróxido de cálcio podem alterar seu tempo de ação e seu poder antimicrobiano. Veículos viscosos, como propilenoglicol ou pelietilenoglicol, apesar de serem solúveis em água, promovem uma dissociação dos íons hidroxila de maneira controlada, provavelmente devido ao seu peso molecular. Veículos aquosos, como a água destilada, promovem a liberação desses íons rapidamente e são solubilizadas também num período de tempo mais curto (FAVA, SAUNDERS, 1999). Já os veículos oleosos, como o óleo de coco, promovem uma dissociação mais lenta dos íons, o que pode explicar a maior porcentagem de viabilidade no grupo em que a pasta foi manipulada com o óleo de coco.

Os resultados mostraram que as pastas de hidróxido de cálcio contendo as drogas, reduziram significativamente a porcentagem de bactérias viáveis no biofilme, sendo diferente das pastas de hidróxido de cálcio pura ou com o óleo de coco como veículo. Os melhores resultados do presente estudo foram para as pastas com adição do diclofenaco sódico e ciprofloxacina respectivamente.

Vários estudos recentes têm revelado que anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) possuem atividade antimicrobiana comprovada.

Dastidar et al. (2000) demonstraram que o diclofenaco sódico tem uma ação altamente bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram negativas pela inibição da síntese de DNA bacteriana. Dutta et al. (2007) em um teste de sinergismo, utilizando o método de difusão em disco de papel, verificaram 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 à outra droga.

Salem-Milani et al. (2013) compararam a ação do diclofenaco sódico, ibuprofeno, amoxicilina e pasta de hidróxido de cálcio contra a linhagem ATCC 29212 de *E. faecalis*. Os autores puderam concluir que as drogas anti-inflamatórias apresentaram pronunciada atividade antibacteriana contra *E. faecalis*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hidróxido de cálcio é muito utilizado atualmente em vários tratamentos endodônticos por seu potencial antisséptico e ação biológica, porém não apresenta eficácia diante de algumas linhagens de bactérias, principalmente aquelas encontradas no interior do canal após a realização do tratamento endodôntico, contabilizando como insucesso do mesmo. Com o desenvolvimento da presente pesquisa, pode-se concluir que quando associado o hidróxido de cálcio e diclofenaco sódico ou ciprofloxacina há uma potencialização de seu efeito sobre a *Enterococcus Faecalis* ATCC 4083.

REFERÊNCIAS

ARIAS, M. P. C. et al. Effect of ultrasonic streaming on intra-dentinal disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. **J Appl Oral Sci.**, v. 26, n. 6, p. 575-581, 2016.

ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Effect of virgin coconut oil enriched diet on the antioxidant status and paraoxonase 1 activity in ameliorating the oxidative stress in rats - a comparative study. **Food Funct**, v. 4, n. 9, p. 1402-1409, Sep. 2013.

BABA, N. et al. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diets containing medium chain triglycerides. **J Am Soc Clin Nutrition**, v. 34, p. 624, 1981.

BABA, N. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium-chain triglyceride. **Am J Clin Nutr**, v. 35, n. 4, p. 678-682, Apr. 1982.

BABAYAN, V.K. Medium chain triglycerides and structured lipids. **Lipids**, v. 22, n. 6, p. 417-420, Jun. 1987.

BACH, A. C.; BABAYAN, V. K. Medium-chain triglycerides: an update. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 36, n. 5, p. 950-962, Nov. 1982.

BERGSSON, G. et al. In vitro inactivation of Chlamydia trachomatis by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 9, p. 2290-2294, Sep. 1998.

BERGSSON, G. et al. In vitro killing of Candida albicans by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 11, p. 3209-3212, Nov. 2001.

CARDOSO, D.A. et al. A coconut virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutr. Hosp**, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, Nov. 2015.

CARPO, B.G.; VERALLO-ROWELL, V.M.; KABARA, J. Noval antibacterial activity of monolaurin compared with conventional antibiotics against organisms from skin infections: an in vitro study. **J Drugs Dermatol**, v. 6, n. 10, p. 991-998, Oct. 2007.

CHAVEZ DE PAZ, L.E. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. **J Endod**, v. 33, n. 6, p. 652-662, Jun 2007.

CWIKLA, S. J. et al. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. **J. Endod.**, v. 31, n. 1, p. 50-52, 2004.

DASTIDAR, S.G. et al. Chakrabarty. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. **Int. J Antimicrob Agents**. V. 14, p. 249-251, 2000.

DISTEL, J.W.; HATTON, J.F.; GILLESPIE, M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**, v. 28, n. 10, p. 689-693, Oct. 2002.

DUTTA, N.K. et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. **Int J Antimicrob Agents**. v. 30, p. 242-49, 2007.

ERCAN, E. et al. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 102, n. 2, p. 27-31, 2006.

ESTRELA, C. et al. O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz. Dent. J.**, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.

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.**, v. 7, n. 1, p. 41-46, 1996.

ESTRELA, C. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J. Endod.**, v. 24, p. 15-17, 1998.

ESTRELA, C. et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. **Braz. Dent. J.** v. 10, p. 63-72, 1999.

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

ESTRELA, C. et al. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 14, n. 1, p. 33-37, 2006.

EVANS, M.D. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 221-228, 2002.

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

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **Int. Endod. J.**, v. 32, p. 267-282, 1999.

FREITAS, R. P. et al. Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. **J. Endod.**, v. 43, n. 1, p. 131-134, 2017.

GARFINKEL, M. et al. Insulinotropic potency of lauric acid: A metabolic rationale for medium chain fatty acids (MCF) in TPN formulation. **Journal of Surgical Research**, v. 52, n. 4, p. 328- 233, Apr. 1992.

GEORGE, S.; BASRANI, B.; KISHEN, A. Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: an *in vitro* study. **J Endod**, v. 36, n. 7, p. 1241-1244, Jul. 2010.

GRIMWOOD, B.E. et al. Coconut palm products: their processing in developing countries. **Journal Article**, n. 99, 1975.

GOMES, B. P. F. de A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. **Braz. Dent. J.**, v. 13, n. 3, p. 155-161, 2002.

GUARTE, W.; MUHLBAUER, M.; KELLERT, M. **Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil.** Postharvest Biol. Technol., v. 9, n. 3, p. 361-371, Dec. 1996.

ISAACS, C.E.; LITOV R.E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **J Nutr Biochem**, v. 6, n. 7, p. 362-366, Jul. 1995.

KABARA J.J.; SWIECZKOWSKI D.M.; CONLEY A.J.; TRUANT J.P. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23-28, Jul. 1972.

KAUNITZ, H. Dietary use of MCT in "Bilanzierte Ernährung in der Therapie," K. Lang, W. Fekl, and G. Berg, eds. George Thieme Verlag, Stuttgart, 1971.

KAUSHIK, M. et al. The Effect of Coconut Oil pulling on Streptococcus mutans Count in Salivain Comparison with Chlorhexidine Mouthwash. **J Contemp Dent Pract**, v. 17, n. 1, p. 38-41, Jan. 2016.

KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KONTAKIOTIS, G. et al. *In vitro* studies of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int.Endod.J.**, v. 28, p. 285-289, 1995.

LINDEBERG, S. et al. Low serum insulin in traditional pacific islanders –the Kitava study. **Metabolism**, v. 48, n. 10, p. 1216-1219, Oct. 1999.

MARINA, A.M.; MAN Y.B.; NAZIMAH, S.A.; AMIN, I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60, n. 2, p. 114–123, Dec. 2008.

MAZUMDAR, K.; DASTIDAR, S. G.; PARK J. H.; DUTTA, N.K. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug target. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 28, n. 8, p.881-91, 2009.

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

MIDENA, R.Z. et al. Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. **J Appl Oral Sci.**, v. 23, n. 5, p. 508-514, Oct 2015.

NAIR, S.S. et al. Virgin coconut oil supplementation ameliorates cyclophosphamide-induced systemic toxicity in mice. **Hum Exp Toxicol**, v. 35, n. 2, p. 205-212, Feb. 2016.

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

PAVASKAR, R. et al. An *in vitro* study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide- and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis*. **J.Endod.**, v. 38, n. 1, p. 95-100, 2012.

PEEDIKAYI, F.C. et al. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: An: An *in vivo* study study. **J Int Soc Prevent Communit Dent**, v. 6, n. 5, p. 447-452, Oct. 2016.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod.J.**, v.36, p.1-11, 2003.

RAMAZANI, M. et al. The Prophylactic Effects of Zintoma and Ibuprofen on Post-endodontic Pain of Molars with Irreversible Pulpitis: A Randomized Clinical Trial. **Iran Endod J.**, v. 8, p.129-134, 2013.

REZENDE, G. P. da S. R. de. et al. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. **Braz. Dent. J.**, v. 19, n. 4, p. 301-305, 2008.

RÔÇAS, I. N. et al. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J.Endod.**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

SABER, S. E. M. et al. Development of naintracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an *in vitro* study. **Eur. J. Dent.**, v. 6, p. 43-50, 2012.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod.**, v. 17, p. 76-78, 1993.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J.Endod.**, v. 20, p.127-129, 1994.

SALEM-MILANI, A. et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. **Jdt.** v. 10, n. 1, p.16-22, 2013.

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

SHIBASAKI I, K. N. Combined effects on antibacterial activity of fatty acids and their esters against gram-negative bacteria. **The pharmacological effect of lipids**, p. 15–24, 1978.

SILVEIRA, C. F. de M. et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. **Eur. J. Dent.**, v. 5, p. 1-7, 2011.

SIQUEIRA Jr. J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int. Endod. J.**, 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.**, v. 112, p. 326-331, 2004.

SOARES, J. A. et al. Residual antibacterial activity of chlorhexidinedigluconate and camphorated P-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 1, p. 8-15, 2007.

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.**, v. 19, n. 1, p. 28-33, 2008.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

TANOMARU, J. M. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int. Endod. J.**, v. 36, p. 733-739, 2003.

THORMAR, H. et al. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 31, n. 1, p. 27-31, Jan. 1987.

VERALLO-ROWELL, V.M.; DILLAGUE, K.M.; SYAH- TJUNDAWAN, B.S. Novel antibacterial and emollient effects of coconut and virgin olive oils in adult atopic dermatitis. **Dermatitis**, v. 19, n.6, p. 308-315, Dec. 2008.

VIANNA, M. E. et al. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. **Braz. Dent. J.**, v. 16, n. 3, p. 175-180, 2005.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod. Dent. Traumatol.** v. 11, p. 15-19, 1995.

ZANCAN, R.F. et al. Do different strains of *E. faecalis* have the same behavior towards intracanal medications in in vitro research? **Braz Oral Res.**, v. 32, p. 32-46, May. 2018.