

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

ANDRESSA MORAIS DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA POTENCIALIZAÇÃO ANTIFÚNGICA DO HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO ASSOCIADO AO ÓLEO DE COCO, SEUS MONOGLICERÍDEOS E
DROGAS ANTIFÚNGICAS SOBRE LINHAGEM ATCC 10231 DE *Candida*
albicans

BAURU

2020

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

ANDRESSA MORAIS DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA POTENCIALIZAÇÃO ANTIFÚNGICA DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO AO ÓLEO DE COCO, SEUS MONOGLICERÍDEOS E DROGAS ANTIFÚNGICAS SOBRE LINHAGEM ATCC 10231 DE *Candida albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia - Centro Universitário Sagrado Coração.
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.

BAURU
2020

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

S237a

Santos, Andressa Morais Dos

Avaliação da potencialização antifúngica do hidróxido de cálcio associado ao óleo de coco, seus monoglicerídeos e drogas antifúngicas sobre linhagem ATCC 10231 de *Candida albicans* / Andressa Morais Dos Santos. -- 2020.

30f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
- Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP

1. Hidróxido de cálcio. 2. Óleo de coco. 3. Monoglicerídeos. 4. Atividade antifúngica. 5. *Candida albicans*. I. Silva, Guilherme Ferreira da. II. Título.

ANDRESSA MORAIS DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA POTENCIALIZAÇÃO ANTIFÚNGICA DO HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO ASSOCIADO AO ÓLEO DE COCO, SEUS MONOGLICERÍDEOS E
DROGAS ANTIFÚNGICAS SOBRE LINHAGEM ATCC 10231 DE *Candida*
albicans

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

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

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

Prof. Dra. Raquel Zanin Midenha Mesquita
Centro Universitário Sagrado Coração

Dedico este trabalho a minha
querida família, com carinho.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento será sempre a Deus, que me abençoou desde o momento em que escolhi a Odontologia como carreira, me dando a oportunidade e me preparando durante todo esse processo incrível que foi a minha formação.

A minha mãe, Sirlene Ferreira de Moraes, minha melhor amiga e principal incentivadora nessa empreitada que foi a graduação. Sua garra, amor, apoio, e esforços incansáveis estarão marcados eternamente em meu coração. Sem você e meus irmãos Caroline Moraes e Pedro Augusto Moraes, eu jamais teria chegado até aqui.

Ao Centro Universitário Sagrado Coração, por todo apoio, estrutura, oportunidades e corpo docente impecável, realmente proporcionando um ensino de excelência, e ao programa de iniciação científica FAP/USC da mesma, pelo apoio financeiro e manutenção da bolsa de auxílio.

E finalmente ao meu orientador Dr. Guilherme Ferreira da Silva por me presentear com grandes ensinamentos, os quais eu jamais pensei que teria acesso, e pela paciência e amor pela pesquisa que demonstrou durante a elaboração da iniciação científica e trabalho de conclusão de curso.

RESUMO

Uma das preocupações que se têm na Endodontia atualmente, é a busca de medicações com o máximo de eficiência na eliminação de microrganismos responsáveis por infecções endodônticas. Dentre estes, encontram-se as leveduras do gênero *Candida albicans*, capazes de formar biofilme na cavidade oral, forma que pode dificultar sua remoção dos tecidos bucais com uma alta resistência aos curativos de demora, entre eles, o hidróxido de cálcio, muito usado no tratamento endodôntico por suas várias propriedades biológicas. Porém, a literatura mostra uma grande resistência desse fungo ao hidróxido de cálcio, sendo esta uma das principais causas de insucesso no tratamento endodôntico. Com o objetivo de melhorar a eficiência da pasta de hidróxido de cálcio contra *C. albicans* (cepa ATCC 10231), o objetivo desta pesquisa foi acrescentar bioprodutos e fármacos com propriedades antifúngicas a este pó, como o óleo de coco, seus monoglicerídeos monolaurina e monocaprina além dos antifúngicos terbinafina e fluconazol e avaliar a atividade das novas pastas frente ao fungo. Para isto, foram utilizadas as técnicas de difusão em ágar e de contato direto para verificar a atividade antifúngica dos produtos em células planctônicas. A análise estatística foi realizada pelos testes Kruskal Wallis para comparação global das pastas e pelo teste de Tukey para comparações individuais, com nível de significância de 5%. A associação do hidróxido de cálcio ao fluconazol potencializou a ação da pasta, com diferença significativa ($p < 0,05$). As pastas de hidróxido de cálcio associadas à monolaurina e monocaprina revelaram mesma atividade antifúngica em relação à pasta pura. Pelo teste do contato direto, todas as pastas inibiram a atividade do fungo, em todas as variáveis de tempo.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio. Óleo de coco. Monoglicerídeos. Atividade antifúngica. *Candida albicans*.

ABSTRACT

One of the concerns currently facing endodontics is the search for medications that are most efficient in eliminating microorganisms responsible for endodontic infections. Among these are *Candida albicans* yeasts, capable of forming biofilm in the oral cavity, which can make it difficult to remove oral tissues with a high resistance to delayed dressings, including calcium hydroxide, widely used in the oral cavity. endodontic treatment for its various biological properties. However, the literature shows a high resistance of this fungus to calcium hydroxide, which is one of the main causes of endodontic treatment failure. In order to improve the efficiency of calcium hydroxide paste against *C. albicans* (strain ATCC 10231), the aim of this research was to add bioproducts and drugs with antifungal properties to this powder, such as coconut oil, its monolaurin and monocaprines monoglycerides. besides the terbinafine and fluconazole antifungals and to evaluate the activity of the new pastes against the fungus. For this, the agar diffusion and direct contact techniques were used to verify the antifungal activity of the products in planktonic cells. Statistical analysis was performed by Kruskal Wallis tests for global paste comparison and Tukey test for individual comparisons, with a significance level of 5%. The association of calcium hydroxide with fluconazole potentiated the paste action, with significant difference ($p < 0.05$). Calcium hydroxide pastes associated with monolaurin and monocaprines showed the same antifungal activity as pure paste. By direct contact testing, all pastes inhibited fungal activity in all time variables.

Keywords: Calcium hydroxide. Coconut oil. Monoglycerides. Antifungal activity. *Candida Albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste da difusão radial sobre a superfície da placa de ágar Sabouraud dextrose (Merck®).....	19
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos halos de inibição em mm referentes ao teste de difusão das pastas sobre ágar Sabouraud frente à linhagem de <i>Candida albicans</i>	ATCC
10231.....	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	21
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVO	28
3.1 OBJETIVO GERAL:	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS ARMAZENADAS	29
4.2 PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO TESTADAS	29
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS AOS VEÍCULOS PELO MÉTODO DA DIFUSÃO RADIAL	29
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS AOS VEÍCULOS PELO MÉTODO DO CONTATO DIRETO .	31
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1 DA LINHAGEM DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> UTILIZADA NO EXPERIMENTO	33
5.2 DA METODOLOGIA DO TESTE DE DIFUSÃO RADIAL UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS.....	34
5.3 DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS PELO TESTE DE DIFUSÃO RADIAL	35
5.4 DA METODOLOGIA DO TESTE PELO CONTATO DIRETO UTILIZADO NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS.....	35
5.5 DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS PELO MÉTODO DO CONTATO DIRETO	36
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O problema dos microrganismos na Endodontia

No campo da Endodontia, o sucesso do tratamento endodôntico baseia-se na máxima desinfecção do sistema de canais radiculares, propiciando um ambiente favorável ao reparo de lesões periapicais, enquanto a persistência de alguns microrganismos exerce um papel significativo nas falhas do tratamento endodôntico (SJOGREN *et al.*, 1997).

Segundo a Associação Americana de Endodontia, considera-se /insucesso endodôntico quando há fístula recorrente ou edema, desconforto à palpação ou percussão, fratura irreparável da unidade dentária, excessiva mobilidade do dente, perda periodontal progressiva e inabilidade do dente de exercer a sua função. (QUALITY ASSURANCE GUIDELINES, 1987)

Dentre muitos fatores que possam estar envolvidos nos casos de insucesso endodôntico, a resistência ao tratamento de microrganismos que se proliferam nos canais radiculares, ou que contaminam o local por infiltrações coronárias, são as principais causas que levam ao fracasso endodôntico. (LIN, 1992; DAHLÉN, 1992; CHEUNG, 1996). Vários microrganismos como bactérias e fungos já foram encontrados e identificados em túbulos dentinários, lesões periapicais, perirradiculares e pulpares. (GOMES, 1996; MOLANDER, 1998; MÖLLER, 1996; NAIR, 1990)

Sabe-se que algumas espécies são mais frequentemente isoladas em casos de fracasso endodôntico em infecções persistentes em comparação a infecções primárias, como as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas sp.* (HAAPASALO, 1983; RANTA, 1988; MOLANDER, 1998) Além de bactérias, as leveduras aparecem como importantes patógenos em lesões endodônticas. (SEN, 1995) As leveduras fazem parte da flora normal do ser humano, podendo ser encontradas em vários locais, como na cavidade oral, pois esta apresenta condições ambientais adequadas para a colonização por fungos. (SHEPHERD, 1992)

Dentre as espécies fúngicas mais predominantes na cavidade oral, destaca-se a levedura *Candida albicans*. (ODDS, 1988) Por ser um microrganismo comensal inofensivo, parece que pequenas alterações em sua

condição são capazes de transformá-lo em um organismo patogênico, ganhando condições de expressar fatores de virulência, como capacidade de adesão a células hospedeiras, formação de hifas, secreção de proteases e fosfolipases, mudança fenotípica e formação de biofilme (SWEET, 1997; CALDERONE et al., 2000)

Na cavidade oral, *C. albicans* possui a habilidade de penetrar nos túbulos dentinários, devido à presença de hifas e de se aderir às células por conta de suas adesinas de superfície celular, que são essenciais, junto com proteases e fosfolipases para a colonização e a infecção das células do hospedeiro, levando a danos nos tecidos perirradiculares. (CALDERONE, 2001).

Embora exista uma taxa de insucesso nos tratamentos endodônticos, o sucesso destes é devido à eficiência dos medicamentos escolhidos para uso.

Um antisséptico muito usado em tratamentos endodônticos é a clorexidina, devido a sua grande eficácia antimicrobiana. (MOHAMMADI, 2009) Por ser uma molécula catiônica, possui uma característica de substantividade, ou seja, possui efeito por mais tempo após sua aplicação (KHADEMI, 2006). A clorexidina é um composto hidrofóbico e hidrofílico que interage com fosfolípidos e lipopolissacarídeos das membranas das células microbianas, entrando na célula por algum tipo de mecanismo de transporte ativo ou passivo. (ATHANASSIADIS et al., 2007) Sua carga positiva interage com a carga negativa do grupo fosfato da parede celular do microrganismo, alterando o equilíbrio osmótico celular, aumentando a permeabilidade, facilitando sua penetração. (GOMES *et al.* 2003a,b; SIQUEIRA & SEN, 2004)

Os derivados azólicos antifúngicos também possuem importância clínica no tratamento endodôntico, especialmente para *C. albicans*. Essas drogas têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol pela interação com a enzima lanosterol demetilase, responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol, componente essencial da membrana fúngica (WYNN et al., 2003).

O uso do hidróxido de cálcio na Endodontia

Um curativo conhecido e já bem documentado na literatura é o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], sendo uma boa escolha para o tratamento endodôntico, por apresentar propriedades com o poder anti-inflamatório, dissolução de restos orgânicos, controle microbiano e inibição de reabsorções inflamatórias (LOPES & SIQUEIRA, 2004).

Como trata-se de uma substância hipertônica quando em relação ao meio, o hidróxido de cálcio consegue absorver os fluídos teciduais, como exudatos inflamatórios, reduzindo a pressão hidrostática tecidual. (LOPES & SIQUEIRA, 2004).

Sua atividade antimicrobiana se deve a liberação de seus íons hidroxilas (OH⁻), aumentando o pH do meio e pela liberação de íons cálcio (Ca²⁺). Este aumento de pH causa dano na membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas, inibição enzimática e dano ao DNA dos microrganismos. Também, quando o hidróxido de cálcio reage com CO₂, há a formação de CaCO₃, e os microrganismos que precisam de CO₂ para sobreviver, são eliminados. (SIQUEIRA & LOPES 1999; KONTAKIOTIS et al., 1995). Além disso, é o único medicamento endodôntico capaz de inibir a ação de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. (SAFAVI; NICHOLS, 1993)

Por conta de os osteoclastos serem ativados pelo LPS bacteriano, com a inibição desse pelo hidróxido de cálcio, também há uma diminuição da reabsorção óssea feita por estas células (SAFAVI; NICHOLS, 1993; JIANG et al, 2003).

Na presença de íons cálcio, os vasos capilares presentes nos tecidos de granulação de dentes desvitalizados diminuem sua permeabilidade, reduzindo o volume de líquido intercelular, havendo um aumento na atividade da enzima pirofosfatase, conhecida por favorecer o mecanismo de reparação e mineralização tecidual. (HEITHERSA, 1995)

Dentre os microrganismos que oferecem resistência ao Ca(OH)₂, está a levedura *C. albicans* (ATHANASSIADIS et al., 2007; LANA et al., 2001; WALTIMO, 1999). Por ter a capacidade de invadir túbulos dentinários, o microrganismo protege-se da ação de instrumentos, irrigantes e medicamentos, dentre estes, os de poder alcalino, devido ao tamponamento da dentina.

(SIQUEIRA *et al.*, 2002; HAAPASALO *et al.*, 2000; NAIR *et al.*, 2005) Por conta disso, geralmente o Ca(OH)_2 é misturado a algum veículo para facilitar sua difusão e aumentar seu poder antimicrobiano. (SAFAVI; NICHOLS, 1993; ESTRELA, 1999^a; ESTRELA, 1999^b)

Óleo de coco

De acordo com Portaria n. 398 de 30/04/99 da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde (MS), alimento funcional é todo aquele alimento que, além do papel básico de nutrir o organismo, contribui com efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos o corpo humano, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. (ANVISA, 1999)

Cocos nucifera, mais conhecido como coco, é um alimento funcional que vem ganhando bastante destaque na culinária e na saúde devido à suas inúmeras propriedades benéficas e terapêuticas. (GUARTE; MUHLBAUER; KELLERT, 1996)

Do coco extrai-se o seu óleo, uma gordura que é um alimento com poderes antimicrobianos, imunomodulador, antioxidante, termogênico, insulínico, antiaterogênico, neuroestimulador, modulador de peso, regulador da dislipidemia sanguínea e além desses, possuem muitos outros efeitos que fazem bem para a saúde humana. (BABA, 1982; GARFINKEL *et al.*, 1992; LINDEBERG *et al.*, 1999; CARDOSO, 2015; PAGE *et al.*, 2009; MARINA *et al.* 2009; ARUNIMA AND RAJAMOHAN, 2012; NAIR *et al.*, 2016)

Dentro da atividade antimicrobiana, o óleo de coco se destaca por ser antibacteriano, antiparasitário, antiviral e antifúngico. (THORMAR *et al.*, 1978; BERGSSON *et al.*, 2001)

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. (GUARTE; MUHLBAUER; KELLERT, 1996; BANZON; VELASCO, 1982; GRIMWOOD, 1975).

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 capróico (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. (KAUNITZ, 1971; BABA *et al.*, 1982; BACH & BABAYAN, 1982)

Os efeitos antimicrobianos dos lipídios têm sido extensivamente estudados ultimamente. (ISAACS *et al.*, 1995; KABARA, 1978; SHIBASAKI, 1978; BERGSSON *et al.*, 1998) Alguns microrganismos 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, vírus Epstein Barr, *Influenza*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria* e *Candida albicans* (KABARA, 1972; BERGSSON; STEINGRI'MSSON; THORMAR, 1999; OGBOLU, 2007 PEEDIKAYIL *et al.*, 2016).

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 (CARPO, 2007; BERGSSON, 1999; VERALLO, 2008; OGBOLU, 2007).

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%). Usado como enxaguante bucal, o óleo diminuiu placas dentais e gengivite, em estudos *in vivo*, comparando-se ao uso de clorexedina (PEEDIKAYIL *et al.*, 2015; PEEDIKAYIL *et al.*, 2016; KAUSHIK *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. (PEEDIKAYI *et al.*, 2016; KAUSHIK *et al.*, 2016)

Thorgeirsdottir *et al.* (2006) demonstraram em seus estudos por difusão radial que a monocaprina foi capaz inibir *Candida albicans*. Bergsson *et al.*, (2001), quando analisaram por microscopia eletrônica de transmissão células de *C. albicans* depois de um tratamento com monocaprina, observou uma desorganização e encolhimento do citoplasma por causa da desintegração da membrana plasmática, resultando em destruição das células fúngicas.

Seleem *et al.* (2016) mostraram atividade antifúngica da monolaurina contra várias cepas de *C. albicans* em formas planctônicas, incluindo cepas resistentes ao fluconazol. No mesmo estudo, foi mostrada uma forte atividade antifúngica *in vitro* da monolaurina contra biofilmes de *C. albicans*. Strandberg *et al.* (2010), em um experimento *in vitro*, mostrou que a monolaurina reduziu a quantidade de *C. albicans* e de outras 5 espécies de *Candida*. No mesmo estudo, agora *in vivo*, a monolaurina foi capaz de matar a *C. albicans* em mulheres com candidíase vaginal, quando aplicada na forma de gel. Quando a monolaurina foi usada na forma de nanopartículas contra biofilme de *C. albicans*, houve uma redução de aproximadamente 94% do biofilme em 48 horas, mostrando que o monoglicerídeo consegue penetrar no biofilme, diferente das drogas convencionais. (LOPES *et al.*, 2016)

Hayama *et al.* (2015), embora não tenha usado monoglicerídeos em seu estudo, usou os ácidos cáprico e láurico contra *C. albicans*. Ele mostrou que os precursores da monocaprina e da monolaurina, respectivamente, foram capazes de inibir o crescimento de hifas das leveduras.

2 JUSTIFICATIVA

Com a resistência aos antimicrobianos se tornando cada vez maior, especialmente em ambientes hospitalares e odontológicos, é extremamente considerável a necessidade de se encontrar agentes antimicrobianos naturais para uso seguro, sem efeitos colaterais e, principalmente sem resistência microbiana.

A ideia de associar o hidróxido de cálcio a alguma outra substância de caráter microbicida, permite potencializar a ação antimicrobiana esperada, além de manter as propriedades biológicas do hidróxido de cálcio, como o alto poder de mineralização.

Devido às excelentes propriedades antifúngicas de grande espectro mostradas nas evidências científicas relatadas, não há nada mais apropriado do que testar o óleo de coco e seus monoglicerídeos monolaurina e monocaprina, em conjunto com o hidróxido de cálcio contra linhagem de *Candida albicans*, já que este microrganismo apresenta alta resistência ao hidróxido de cálcio e, ainda há poucos estudos na literatura com o uso desses lipídios contra *C. albicans*. Além disso, é o primeiro estudo a testar a associação entre o hidróxido de cálcio e monoglicerídeos presentes no óleo de coco.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL:

Testar se a adição de diferentes bioprodutos e fármacos antifúngicos ao hidróxido de cálcio influencia em sua atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* pelo método da difusão radial das pastas CaOH₂ + propilenoglicol; CaOH₂ + clorexidina; CaOH₂ + óleo de coco; CaOH₂ + monolaurina; CaOH₂ + monocaprina; CaOH₂ + terbinafina + veículo propilenoglicol; CaOH₂ + fluconazol + veículo propilenoglicol contra células planctônicas de *Candida albicans*.

b) Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* pelo método do contato direto das pastas CaOH₂ + propilenoglicol; CaOH₂ + clorexidina; CaOH₂ + óleo de coco; CaOH₂ + monolaurina; CaOH₂ + monocaprina; CaOH₂ + terbinafina + veículo propilenoglicol; CaOH₂ + fluconazol + veículo propilenoglicol contra células planctônicas de *Candida albicans*.

Mensurar o pH das pastas CaOH₂ + propilenoglicol; CaOH₂ + clorexidina; CaOH₂ + óleo de coco ; CaOH₂ + monolaurina; CaOH₂ + monocaprina; CaOH₂ + terbinafina + veículo propilenoglicol; CaOH₂ + fluconazol + veículo propilenoglicol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foi utilizado uma linhagem padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) 10231 de *C. albicans*.

4.1 ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS ARMAZENADAS

A cepa ATCC 10231 foi ativada em placa de ágar Sabouraud dextrose (Merck®) incubada em estufa micológica a 37°C por 24 a 48 horas.

4.2 PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO TESTADAS

Para os testes de atividade antifúngica, sete diferentes pastas de CaOH₂ foram testadas, conforme segue: CaOH₂ + propilenoglicol; CaOH₂ + clorexidina; CaOH₂ + óleo de coco; CaOH₂ + monolaurina; CaOH₂ + monocaprina; CaOH₂ + terbinafina + veículo propilenoglicol; CaOH₂ + fluconazol + veículo propilenoglicol.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS AOS VEÍCULOS PELO MÉTODO DA DIFUSÃO RADIAL

Para se avaliar a atividade antifúngica das pastas de CaOH₂ estudadas, foi utilizada a técnica de difusão radial sobre a superfície da placa de ágar Sabouraud dextrose (Merck®), segundo Weckwerth *et al.*, 2011.

A partir da placa de ativação da levedura, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo Sabouraud dextrose (Merck®) que foi incubado a 37°C “overnight”.

A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 1,0 de McFarland (3×10^8 Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹). Uma placa de Petri de 150 x 10 mm previamente preparada com ágar Sabouraud dextrose (Merck®) na espessura de 6 mm foi escavada em 7 poços com 4 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. A semeadura foi feita através de zaragatoa de algodão estéril na superfície da placa, tomando-se o cuidado de não semear o interior das escavações.

A placa foi colocada em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio de cultura antes da colocação das pastas. A pasta pura de Ca(OH)_2 foi manipulada a partir do pó até se obter a consistência de creme dental, utilizando-se como veículo o propilenoglicol. As pastas associadas aos bioprodutos e fármacos foram proporcionadas a 5% do peso total de hidróxido de cálcio, utilizando-se também o veículo propilenoglicol. Após a espatulação, os poços foram preenchidos com as pastas através de seringas e a placa foi deixada 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação.

Após esse período, foi incubada em estufa 37°C , sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital sob luz refletida. O teste foi realizado em triplicata (Figura 1).

Figura 1 – Teste da difusão radial sobre a superfície da placa de ágar Sabouraud dextrose (Merck®)



Fonte: Elaborada pela própria autora.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS AOS VEÍCULOS PELO MÉTODO DO CONTATO DIRETO

Para se avaliar a atividade antifúngica das pastas de CaOH_2 estudadas, foi utilizada a técnica do contato direto das pastas com cones de papel contaminados com a linhagem ATCC 10231 de *C. albicans*, segundo Weckwerth *et al.*, 2011.

A partir das placas de ativação das leveduras, cinco colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo Sabouraud dextrose (Merck®) que foi incubado a 37°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 1,0 de McFarland (3×10^8 Unidades Formadoras de Colônias mL^{-1}). Para cada linhagem testada, 24 cones de papel absorvente estéreis (Tanari, Tanariman Indústria Ltda., Manacaru, Brasil), foram imersos por cinco minutos na suspensão fúngica para contaminação. Após este período, estes cones foram distribuídos em placas de Petri estéreis e foram cobertas com as sete diferentes pastas de CaOH_2 . Um cone foi coberto com salina estéril que serviu como controle. As placas foram mantidas em câmara úmida em estufa. Nos intervalos de tempo de 4, 24 e 48 horas, os cones foram

removidos do contato com as pastas e foram imersos em tubos contendo 5 mL de caldo Lethen (Difco) estéreis, que foram incubados a 37°C por 48 horas e avaliados quanto à turbidez macroscópica. Subsequentemente, 100 µL do caldo Lethen foi transferido para tubos contendo 5 mL de caldo Sabouraud dextrose (Merck®) que foi incubado nas mesmas condições do caldo Lethen. Após 24 horas, de todos os tubos foram retiradas alíquotas de 100 µL que foram semeadas na superfície do ágar Sabouraud dextrose (Merck®), a fim de se determinar a viabilidade fúngica. Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob condições assépticas e em triplicata.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a tabulação dos dados, foi realizada a análise estatística pelo teste Kruskal Wallis para comparação global, e teste de Tukey para comparações individuais, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 revela os resultados obtidos pelos testes de difusão das pastas sobre a superfície do ágar Sabouraud. A associação do hidróxido de cálcio ao fluconazol, potencializou a ação da pasta, com diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 1. Resultados dos halos de inibição em mm referentes ao teste de difusão das pastas sobre ágar Sabouraud frente à linhagem de *Candida albicans* ATCC 10231

Pastas	Halo de inibição em mm		
CaOH	20	20	20
CaOH + Monolaurina	20	20	20
CaOH + Monocaprina	20	20	20
CaOH + Fluconazol	28	28	28
CaOH + Terbinafina	20	20	20
CaOH + Óleo de Coco	0	0	0
CaOH + Clorexidina	20	20	20

CaOH – hidróxido de cálcio

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1 DA LINHAGEM DE *CANDIDA ALBICANS* UTILIZADA NO EXPERIMENTO

Foi utilizada para o experimento, uma estirpe padrão de *Candida albicans* ATCC 10231. A *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas a partir de sítios anatômicos como pele, unha, vagina, mucosa ocular e mucosa oral. Estima-se que 46% dos indivíduos saudáveis sejam portadores de *C. albicans* na microbiota bucal (Weckwerth *et al.*, 2012).

A *Candida albicans* consiste em uma levedura presente em casos de infecções dos canais radiculares e caracteriza-se por ser capaz de sobreviver a uma vasta variação de valores de pH (Baumgartner, 2000; Weckwerth *et al.*, 2012).

Vários estudos avaliaram *in vitro* a resistência dessa levedura ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (CaOH_2) (Waltimo *et al.*, 1999a; Ferguson *et al.*, 2002). Pelo fato da levedura sobreviver em ampla variação de pH, a alcalinidade do CaOH_2 pode não apresentar efeito antimicrobiano esperado (Holmes *et al.*, 1991).

Estudos com a associação do hidróxido de cálcio combinado com diferentes fármacos e veículos foram realizados para avaliar a atividade antifúngica frente à levedura *Candida albicans* (Delgado *et al.*, 2013; Ercan *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2005; Turk *et al.*, 2009). Vianna *et al.*, 2005 realizaram uma avaliação *in vitro* pelo teste de diluição em caldo, da atividade antimicrobiana do CaOH_2 em associação com diferentes veículos: água destilada, glicerina, PMCC (paramonoclorofenol canforado), PMCC + glicerina, e PMCC + polietilenoglicol. A susceptibilidade microbiana em ordem crescente foi: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*. Assim, concluiu-se que as pastas de hidróxido de cálcio precisam de um tempo maior para a eliminação de micro-organismos facultativos em relação aos anaeróbios, além disso, afirmam que a atividade antimicrobiana está relacionada com as formulações das pastas e com as susceptibilidades microbianas.

5.2 DA METODOLOGIA DO TESTE DE DIFUSÃO RADIAL UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS

Um dos protocolos utilizados na metodologia do presente estudo foi o relacionado com a técnica de difusão radial sobre a superfície de placas de ágar Sabouraud dextrose (Merck®). Essa metodologia vem sendo amplamente utilizada no estabelecimento do espectro antimicrobiano do hidróxido de cálcio (Estrela *et al.*, 2001; Weckwerth *et al.*, 2011; Miyagak *et al.*, 2006).

No entanto Pumarola *et al.* (1992) descreveram algumas dificuldades e limitações presentes no teste de difusão como a padronização da densidade do inóculo pela escala de Mc Farland, a escolha do meio de cultura ideal, as condições de estocagem das placas, tempo e temperatura de incubação. Além disso, esse teste caracteriza-se como qualitativo, uma vez que revela apenas a

susceptibilidade microbiana por meio da medida dos halos de inibição, não distinguindo assim as propriedades bactericidas e bacteriostáticas dos materiais testados, nem fornece quaisquer informações sobre a viabilidade do micro-organismo testado (Tobias, 1988). Também, sendo o meio de cultura uma substância sólida, pode existir dificuldade de difusão dos íons hidroxila para o ágar, tornando assim mais uma dificuldade de interpretação nesta técnica.

5.3 DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS PELO TESTE DE DIFUSÃO RADIAL

Por meio dos testes estatísticos observou-se diferença entre os valores medianos do grupo da pasta associada ao fluconazol com todas as outras pastas. Diante disso, os resultados estatísticos nos permitem concluir que as associações das pastas de hidróxido de cálcio com o fluconazol revelou atividade antifúngica significativamente mais eficaz do que as comparadas com as associações das pastas com as outras drogas, corroborando os achados de Weckwerth *et al.*, 2015. A adição da monolaurina à pasta de hidróxido de cálcio não potencializou seu efeito, contrariando os achados de Seleem *et al.*, 2016, que revelou que esta substância tem atividade antifúngica. Isto pode ter ocorrido em virtude da má difusão da monolaurina no teste ou devido sua inibição pelo hidróxido de cálcio. Também, a monocaprina não potencializou o efeito da pasta, contrariando os achados de Thorgeirsdóttir *et al.*, 2006.

5.4 DA METODOLOGIA DO TESTE PELO CONTATO DIRETO UTILIZADO NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS

Outro protocolo utilizado no presente estudo foi o teste do contato direto das pastas com cones de papel contaminados com as linhagens de *C. albicans*. Esse método qualitativo é utilizado em muitos estudos por estar diretamente correlacionado com a eficácia das pastas, ser independente de muitas variáveis como no método da difusão e por ser de fácil execução prática (Estrela *et al.*, 2001).

Weckwerth *et al.*, 2012 avaliaram a susceptibilidade de cepas de *Candida albicans* oral em diferentes níveis de pH e com solução aquosa

saturada de hidróxido de cálcio. Após 48 h de contato com a solução de hidróxido de cálcio as cepas de *Candida albicans* tornaram-se completamente inviáveis e, quando expostas ao caldo de cultura alcalina, apresentaram viabilidade em pH de 9,5 a 10,5 por até 7 dias. Diante disso, a levedura só pode ser completamente inibida após 48 h de contato direto com uma solução saturada aquosa de hidróxido de cálcio.

5.5 DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS PASTAS ASSOCIADAS ÀS DROGAS PELO MÉTODO DO CONTATO DIRETO

Na avaliação da atividade antifúngica pela técnica do contato direto, todas as pastas mostraram-se eficientes em inviabilizar as leveduras em todas as variáveis de tempo. Estes dados obtidos em nosso estudo corroboram os achados de Estrela *et al.*, 2001. A hipótese para tal fato está suportada na provável inativação enzimática e nos danos realizados na membrana citoplasmática das leveduras pelo hidróxido de cálcio, favorecendo a destruição das mesmas, independentemente de sua associação com as drogas estudadas. Isto se deve, provavelmente, às condições extremas de pH (12,6) obtidas no momento da espatulação das pastas e mantido por um longo período, durante o qual existe uma total perda da atividade biológica das leveduras (Estrela *et al.*, 1998). Parece lógico que a atividade antifúngica depende da liberação dos íons hidroxila pelas pastas (Estrela *et al.*, 2001). Resultado semelhante ao nosso estudo foi obtido por Estrela *et al.*, 2001 onde, pela mesma técnica de contato direto, a levedura *C. albicans* foi inibida após 48h de contato, independente da associação com a drogas utilizadas.

6 CONCLUSÃO

- a) A associação do hidróxido de cálcio ao fluconazol potencializou a ação da pasta, com diferença significativa ($p < 0,05$).
- b) As pastas de hidróxido de cálcio associadas à monolaurina e monocaprina revelaram mesma atividade antifúngica em relação à pasta pura.
- c) Pelo teste do contato direto, todas as pastas inibiram a atividade do fungo, em todas as variáveis de tempo.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 03 maio. 1999. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html. Acesso em: 31 jan 2020.
- ARUMINA 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**. 2013;4(9):1402–9.
- ATHANASSIADIS B, Abbott PV, Walsh LJ (2007) The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Australian Dental Journal**. 2007;52(Suppl):S64–82.
- BABA N, Bracco EF, Seylar J, Hashim SA. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diets containing medium chain triglycerides. **J Am Soc Clin Nutrition**. 1982;35(4):678-82.
- BABA N. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium-chain triglyceride. **Am J Clin Nutr**. 1982;35(4):678-682.
- BABAYAM VK. Medium chain triglycerides and structured lipids. **Lipids**. 1987;22(6):417-20.
- BACH AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. **Am. J. Clin. Nutr**. 1982;36(5):950-62.
- BANZON JA, Velasco JR. Coconut Production and Utilization. **PCRDF Manila**. 1982.
- BERGSSON G, Arnfinnsson J, Karlsson SM, Steingrímsson Ó, Thormar H. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 1998;42(9):2290-4.
- BERGSSON G, Arnfinnsson J, Steingrímsson O´, Thormar H. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001;45(11):3209-12.
- BERGSSON G, Steingrimsson O, Thormar H. *In vitro* susceptibilities of *Neisseria Gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents Chemother**. 1999;43(11):2790-2.
- CALDERONE R, Suzuki S, Cannon R, Cho T, Boyd D, Calera J, et al. *Candida albicans* adherence, signalling and virulence. **Med Mycol**. 2000;38(sup1):125-37.

CALDERONE R.A., Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.** 2001;9(7):327–35.

CARDOSO DA, Moreira AS, de Oliveira GM, Raggio Luiz R, Rosa G. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutricion hospitalaria.** 2015;32(5): 2144-52

CARPO BG, Verallo-Rowell VM, Kabara J. Noval antibacterial activity of monolaurin compared with conventional antibiotics against organisms from skin infections: an in vitro study. **J Drugs Dermatol.** 2007;6(10): 991-8.

CHEUNG GSP. Endodontic failures- changing the approach. **International Dental Journal.** 1996;46(3):131-8.

DAHLÉN G, Müller AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, eds. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, 1992:444-75.

ESTRELA C, Bammann LL. Medicação Intracanal. In: Estrela C, Figueiredo JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: **Artes Médicas.** 1999:573-644.

ESTRELA C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CRA, Bammann LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J.** 1999;10(2):63-72.

GARFINKEL M, Lee S, Opara EC, Akwari OE. Insulinotropic potency of lauric acid: a metabolic rationale for medium chain fatty acids (MCF) in TPN formulation. **Journal of Surgical Research.** 1992;52(4):328-33.

GOMES BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. **International Endodontic Journal.** 2003b;36(9):604–9.

GOMES BPFA, Drucker, DB, LILLEY, JD. Clinical significance of dental root canal microflora. **J Dent.** 1996; 24(1-2):47-55.

GOMES BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **International Endodontic Journal.** 2003a;36(4):267–75.

GRIMWOOD BE. Coconut Palm Products. **FAO**, Rome. 1975.

GUARTE, R. C.; MUHLBAUER, W.; KELLERT, M. Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, n. 3, p. 361-372, 1996.

HAAPASALO HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. **Int Endod J**. 2000;33(2):126-31.

HAAPASALO M, Ranta K, Ranta H. Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. **Acta Odontol Scand**. 1983;41(1):19-22.

HAYAMA K, Takahashi M, Yui S, Abe S. Inhibitory effects of several saturated fatty acids and their related fatty alcohols on the growth of *Candida albicans*. **Drug Discov Ther**. 2015;9(6):386-90.

HEITHERSAY GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. Apud: Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of calcium hydroxide and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**. 1995;6:85-90.

ISAACS CE, Litov RE, Thormar H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **Nutr Biochem**. 1995;6(7):362-6.

JIANG J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2003;95(3):348-54.

KABARA JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 1972;2(1):23-8.

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, Reddy P, Sharma R, Udameshi P, Mehra N, Marwaha A. The Effect of Coconut Oil pulling on *Streptococcus mutans* Count in Salivain Comparison with Chlorhexidine Mouthwash. **J Contemp Dent Pract**. 2016;17(1):38-41.

KHADEMI AA, Mohammadi Z, Havaee A (2006) Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. **Australian Endodontic Journal**. 2006;32(3):112-5.

KONTAKIOTS E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int Endod J**. 1995;28(6):285-9.

LANA MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, *et al*. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. **Oral Microbiol Immunol**. 2001;16(2):100-5.

LIN ML, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Factors associated with endodontic treatment failures. **J. Endod**. 1992;18(12):625-7.

- LINDEBERG S, Eliasson M, Lindahl B, Ahrén B. Low serum insulin in traditional Pacific Islanders—the Kitava Study. **Metabolism-Clinical and Experimental**. 1999;48(10):1216-9.
- LOPES HP, Siqueira Jr. JF. Medicação Intracanal. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, Endodontia Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: **Meds**. 2004:581-618.
- LOPES LQS, Santos CG, de Almeida Vaucher R, Raffin RP, Santos RCV. Nanocapsules with glycerol monolaurate: Effects on *Candida albicans* biofilms. **Microbial pathogenesis**. 2016;97:119-124.
- MARINA AM, Man YB, Nazimah SA, Amin I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **Int J Food Sci Nutr**. 2009;60(sup2):114–23.
- MOHAMMADI. Z., Abboott. P. V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **Inter. Endo. Journal**. 2009;42(4):288–302.
- MOLANDER A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbial status of root filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**. 1998;31(1):1-7
- MOLANDER A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**. 1998;31(1):1-7.
- MÖLLER AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. **Odontol Tidskr**. 1966;74:1-380.
- NAIR PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molar with primary apical periodontitis after "one visit" endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2005;99(2):231-52.
- NAIR PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intrarradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow up-study. **J Endod**. 1990;16(12):580-8.
- NAIR SS, Manalil JJ, Ramavarma SK, Suseela IM, Thekkepatt A, Raghavamenon AC. Virgin coconut oil supplementation ameliorates cyclophosphamide-induced systemic toxicity in mice. **Hum Exp Toxicol**. 2016;35(2):205-12.
- ODDS FC (1988). *Candida and candidosis—a review and bibliography*. 2nd ed. London: **Baillière Tindall**-W.B. Saunders.
- OGBOLU DO, Oni AA, Daini OA, Oloko AP. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. **J Med Food**. 2007;10(2):384-7.
- ÓSK THORGEIRSDÓTTIR T, Kristmundsdóttir T, Thormar H, Axelsdóttir Í, Peter Holbrook W. Antimicrobial activity of monocaprin: a monoglyceride with potential use as a denture disinfectant. **Acta Odontologica Scandinavica**. 2006;64(1):21-6.

PAGE KA, Williamson A, Yu N, McNay EC, Dzuira J, McCrimmon RJ, et al. Medium-chain fatty acids improve cognitive function in intensively treated type 1 diabetic patients and support in vitro synaptic transmission during acute hypoglycemia. **Diabetes**. 2009;58(5):12337-44.

PEEDIKAYIL FC, Sreenivasan P, Narayanan A. Effect of coconut oil in plaque related gingivitis — A preliminary report. **Nigerian Medical Journal: Journal of the Nigeria Medical Association**. 2015;56(2):143-147.

PEEDIKAYL FC, Remy V, John S, Chandru TP, Sreenivasan P, Bijapur GA. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: An *in vivo* study study. **J Int Soc Prevent Communit Dent**. 2016;6(5):447-52.

PUMAROLA J, Berastegui E, Brau E, Canalda C, Jiménez de Anta MT. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**. 1992 Aug;74(2):216-220.

QUALITY ASSURANCE GUIDELINES (1987) Chicago, **American Association of Endodontics**, p 1-27.

RANTA K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. **Endod Dent Traumatol**. 1988;4(6):269-72.

SAFAVI KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod**. 1993;19(2):76-8.

SELEEM D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM. *In vitro* evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. **Peer J**. 2016;4:e2148.

SEN BH, Piskin B, Demirci D (1995). Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endod Dent Traumatol**. 1995;11(1):6-9.

SHEPERD MG (1992). Basic mycology. In: **Contemporary oral microbiology and immunology**. Slots J, Taubman MA, editors. St. Louis, MO: Mosby

SHIBASAKI I, Kato N. Combined effects on antibacterial activity of fatty acids and their esters against gram-negative bacteria. In: Kabara JJ, ed. **The pharmacological effect of lipids**. St. Louis: American Oil Chemists Society, 1978:15–24.

SIQUEIRA JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. **J Endod**. 2002;28(11):770-3.

SIQUEIRA JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2004;97(5):632–41.

SIQUEIRA JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**. 1999;32(5):361–9.

SJOGREN U, Fidgor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Inter Endod J**. 1997;30(5):297-306.

STRANDBERG KL, Peterson ML, Lin YC, Pack MC, Chase DJ, Schlievert PM. Glycerol monolaurate inhibits *Candida* and *Gardnerella vaginalis* in vitro and in vivo but not *Lactobacillus*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2010;54(2):597–601.

SWEET SP (1997). Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral Dis** 3(Suppl 1):S88-S95.

THORMAR H, Isaacs CE, Brown HR, Barshatzky MR, Pessolano T. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents Chemother**. 1987;31(1):27-31.

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

VERALLO-ROWELL VM, Dillague KM, Syah-Tjundawan BS. Novel antibacterial and emollient effects of coconut and virgin olive oils in adult atopic dermatitis. **Der- matitis**. 2008;19(6):308-15.

WALTIMO TMT, Qrstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibilidade de *Candida albicans* a quatro desinfetantes e suas combinações. **Int J Endod**. 1999;32(6):421-9.

WECKERTH PH, Siquinelli NB, Weckwerth ACVB, Vivian RR, Duarte MAH. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide associated with different substances against *Enterococcus faecalis* strains. **Dental Press Endod**. 2011;1(1):46-51.

WYNN RL, Jabra-rizk MA, Meiller TF. Fungal drug resistance, biofilms, and new antifungals. **Gen Dent**. 2003;51(2):94–8.