



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CAROLINE ZAMIN

APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA EM  
CANALIS RADICULARES E TÚBULOS DENTINÁRIOS INFECTADOS COM  
*Enterococcus faecalis* E *Candida albicans*

Piracicaba

2017

**CAROLINE ZAMIN**

**APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA EM  
CANAIS RADICULARES E TÚBULOS DENTINÁRIOS INFECTADOS COM  
*Enterococcus faecalis* E *Candida albicans***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINE ZAMIN, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE.

Piracicaba

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

Z14a Zamin, Caroline, 1981-  
Aplicação de óleos essenciais como solução irrigadora em canais radiculares e túbulos dentinários infectados com *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* / Caroline Zamin. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. *Candida albicans*. 3. Óleos voláteis. 4. Irrigantes do canal radicular. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Essential oils application as irrigating solution in root canals and dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*

**Palavras-chave em inglês:**

*Enterococcus faecalis*

*Candida albicans*

Oils, volatile

Root canal irrigants

**Área de concentração:** Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

**Titulação:** Doutora em Odontologia

**Banca examinadora:**

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Augusto Shoji Kato

Rielson José Alves Cardoso

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Glyn Mara Figueira

**Data de defesa:** 16-02-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 16 de Fevereiro de 2017, considerou a candidata CAROLINE ZAMIN aprovada.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE

PROF. DR. AUGUSTO SHOJI KATO

PROF. DR. RIELSON JOSÉ ALVES CARDOSO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. GLYN MARA FIGUEIRA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, por ter me dado força e perseverança para obter essa vitória, e aos meus pais, Ocidio e Nelsa, meus exemplos de caráter e dignidade, por estarem ao meu lado incondicionalmente. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, juntamente com a Universidade Comunitária da Região de Chapecó por oportunizarem este doutorado interinstitucional - Dinter.

Agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte pela atenção, disponibilidade e gentileza cedida a este trabalho. Saiba que és uma inspiração como pessoa e profissional que sempre irei me espelhar.

Obrigada aos professores do Dinter, Prof. Dr. Antônio Carlos Pereira, Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury, Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga, Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta, Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, e em especial, à Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora do programa

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela ajuda na metodologia e por ter disponibilizado o laboratório de Endodontia da FOP para execução de parte desta pesquisa. Minha gratidão e admiração!

Sou muito grata aos amigos que fiz neste caminho, em especial a Renata Maria Teixeira Duarte e sua família, que me acolheram em sua casa, tornando este desafio mais leve e alegre. À Ericka Letícia da Silva, pela amizade e empatia que levarei para toda a vida. À Beatriz Angelo, pelo auxílio na execução dos ensaios *in vitro*. À Camila Delarmelina e toda a equipe, pelo acolhimento e solidariedade que fui recebida no CPQBA/Unicamp.

A Gabriel Abuna e Maicon Ricardo Zieberg Passini pela assistência, paciência e prestatividade durante a execução da fase experimental na FOP/Unicamp.

À toda minha família, amigos e colegas pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Amo vocês!

## RESUMO

A bioprospecção de produtos provenientes de fontes naturais para utilização em endodontia tem sido considerada como alternativa às soluções sintéticas usadas tradicionalmente. Neste contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, patógenos do canal radicular reconhecidos como resistentes aos procedimentos endodônticos. Foi utilizado o método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentrações bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínimas. Os óleos essenciais mais ativos foram analisados quanto sua composição química e combinados em blendas para avaliação quanto às propriedades indispensáveis para caracterizar uma solução irrigadora, como ação antimicrobiana em canais radiculares e túbulos dentinários de dentes humanos extraídos, citotoxicidade e tensão superficial. Os resultados mostraram que a blenda dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* e *Tetradenia riparia*, na proporção 1:1 foi a mais efetiva tanto sobre células planctônicas como em biofilmes dos endopatógenos, a partir de 2,5 mg/mL. Os compostos majoritários identificados nos óleos foram o trans-geraniol no óleo essencial de *C. martinii* (85,39%) e sesquiterpenos oxigenados no óleo essencial de *T. riparia* (50,88%). Ainda, o óleo de *C. martinii* demonstrou moderada citotoxicidade sobre queratinócitos humanos, enquanto o óleo essencial de *T. riparia* apresentou ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas. Quando analisada a tensão superficial das soluções irrigadoras em estudo, verificou-se valor significativamente menor para o óleo de *C. martinii*, seguido pelo óleo de *T. riparia* ( $p < 0,05$ ). Em seguida, segmentos radiculares de dentes humanos extraídos foram inoculados com *E. faecalis* e *C. albicans* por meio de centrifugação, para permitir a penetração dos micro-organismos nos túbulos dentinários, sendo incubados a 37 °C durante 15 dias. Amostras foram coletadas dos canais radiculares antes e após a instrumentação, sendo plaqueadas em meios de cultura específicos para cada micro-organismo. Os canais radiculares foram preparados utilizando o sistema Reciproc® R25, sendo realizada a irrigação com diferentes soluções, sendo G1: blenda dos óleos *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL; G2: blenda dos óleos *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL; G3: blenda dos óleos *C. martinii* e *T. riparia* 5 mg/mL; G4: hipoclorito de sódio 5,25%; G5: gel de digluconato de clorexidina 2% + soro fisiológico e G6: Solução aquosa de Tween 80 a 0,1%. Após tratamento, as raízes foram seccionadas no sentido transversal em máquina de corte de precisão, obtendo-se fatias de dentina de 1 mm de espessura de cada terço radicular. Estas amostras foram analisadas individualmente por microscopia confocal de varredura a laser, determinando-se quantitativamente os micro-organismos viáveis e não-viáveis. Concluiu-se que a blenda dos óleos de *T. riparia* e *C. martinii*, na concentração de 5 mg/mL apresentou ação antimicrobiana sobre biofilme misto de *E. faecalis* e *C. albicans* nas paredes do canal radicular principal de dentes humanos extraídos, bem como sobre os micro-organismos confinados no interior de túbulos dentinários, com resposta estatisticamente semelhante às soluções mais utilizadas como irrigantes em endodontia, podendo ser sugerida como uma alternativa adicional aos tratamentos convencionais.

**Palavras-chave:** *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Óleos voláteis. Irrigantes do canal radicular.

## ABSTRACT

The bioprospecting of natural products for use in endodontics has been considered as an alternative to synthetic solutions used traditionally. In this context, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of different essential oils on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, root canal pathogens recognized as resistant to endodontic procedures. The microdilution method was used to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bacterial (CBM) and fungicide (CFM) concentrations. The most active essential oils were analyzed for their chemical composition and combined in blends to evaluate the properties necessary to characterize an irrigating solution, such as antimicrobial action in root canals and dentinal tubules of extracted human teeth, cytotoxicity and surface tension. The results showed that the blend of *Cymbopogon martinii* and *Tetradenia riparia* oils at 1:1 was the most effective in both the planktonic cells and in biofilms of the endopathogens, from 2.5 mg/mL. The major compounds identified in the oils were trans-geraniol in *C. martinii* (85.39%) and oxygenated sesquiterpenes in *T. riparia* (50.88%). Furthermore, *C. martinii* essential oil showed moderate cytotoxicity on human keratinocytes, while *T. riparia* essential oil showed no cytotoxicity at the concentrations tested. When surface tension of irrigating solutions under study was analyzed, a significantly lower value for the *C. martinii* oil was verified, followed by *T. riparia* ( $p < 0.05$ ). Subsequently, root segments of extracted human teeth were inoculated with *E. faecalis* and *C. albicans* by centrifugation to allow penetration of microorganisms in the dentinal tubules and were incubated at 37 °C for 15 days. Samples were collected from the root canal before and after instrumentation, and were plated in culture media specific to each microorganism. The root canals were prepared using the Reciproc® R25 system and irrigation was performed with different solutions, being G1: blend of *C. martinii* and *T. riparia* essential oils at 0.5 mg/mL; G2: blend of *C. martinii* and *T. riparia* essential oils at 2.5 mg/mL G3: blend of *C. martinii* and *T. riparia* essential oils at 5 mg/mL G4: Sodium hypochlorite 5.25% G5: Chlorhexidine digluconate gel 2% plus saline solution and G6: Aqueous solution of Tween 80 0.1%. After treatment, the roots were cross-sectioned in a precision cutting machine, obtaining 1 mm thick dentin slices from each third root. These samples were analyzed individually by confocal laser scanning microscopy determining quantitatively the viable and non-viable microorganisms. It was concluded that the blend of *C. martinii* and *T. riparia* essential oils at 5 mg/mL presented antimicrobial action on mixed biofilms of *E. faecalis* and *C. albicans* on the walls of the main root canal of extracted human teeth, as well as on microorganisms confined within the dentinal tubules, with response statistically similar to commonly used solutions in endodontics and may be suggested as additional alternative to conventional treatments.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Volatile oils. Root canal irrigants.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Inibição da formação de biofilme pelo <i>E. faecalis</i> IC na presença de óleos essenciais, após 48 h de incubação	67
Figura 2 - Inibição da formação de biofilme pelo <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença de óleos essenciais, após 48 h de incubação	67
Figura 3 - Inibição da formação de biofilme pelo <i>C. albicans</i> IC na presença de óleos essenciais, após 48 h de incubação	68
Figura 4 - Inibição da formação de biofilme pelo <i>C. albicans</i> CBS 562 na presença de óleos essenciais, após 48 h de incubação	68
Figura 5 - Cromatograma do óleo essencial de <i>C. martinii</i>	69
Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de <i>T. riparia</i>	69
Figura 7 - Espectro de massas do analito com $t_R = 34,80$ min (sesquiterpeno)	70
Figura 8 - Espectro de massas do analito com $t_R = 44,62$ min (diterpeno)	71
Figura 9 - Espectro de massas do analito com $t_R = 50,48$ min (diterpeno)	71
Figura 10 - Comprovação por MEV da contaminação microbiana no interior dos túbulos dentinários radiculares após o período de inoculação	75
Figura 11 - Comprovação por MEV da contaminação microbiana na luz do canal radicular principal após o período de inoculação	75
Figura 12 – Confirmação por MCVL da contaminação dos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul)	76
Figura 13 - Confirmação por MCVL da contaminação dos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul)	77

Figura 14 - Confirmação por MCVL da contaminação dos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 78

Figura 15 – Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 83

Figura 16 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 84

Figura 17 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 85

Figura 18 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 86

Figura 19 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 87

Figura 20 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não

viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 88

Figura 21 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 89

Figura 22 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 90

Figura 23 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 91

Figura 24 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com hipoclorito de sódio 5,25%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 92

Figura 25 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com hipoclorito de sódio 5,25%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 93

Figura 26 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com hipoclorito de sódio 5,25%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 94

Figura 27 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com clorexidina gel 2%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 95

Figura 28 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com clorexidina gel 2%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 96

Figura 29 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por em MCVL após tratamento com clorexidina gel 2%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 97

Figura 30 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL, após tratamento com Tween 80 a 0,1%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 98

Figura 31 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL, após tratamento com Tween 80 a 0,1%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 99

Figura 32 - Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL, após tratamento com Tween 80 a 0,1%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul) 100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas medicinais e aromáticas da CPMA selecionadas para o presente estudo	48
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM – mg/mL) dos óleos essenciais frente aos micro-organismos estudados	63
Tabela 3 - Concentração bactericida e fungicida mínimas (CBM/CFM - mg/mL) dos óleos essenciais frente aos micro-organismos estudados	64
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana (CIM e CBM/CFM - mg/mL) das blendas dos óleos essenciais frente aos micro-organismos estudados	64
Tabela 5 - Compostos identificados, tempo de retenção (tR), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) no óleo essencial de <i>C. martinii</i>	69
Tabela 6 - Analitos identificados no óleo essencial de <i>T. riparia</i>	69
Tabela 7 - Tensão superficial (mN/m) e densidade (g/mL)	72
Tabela 8 - Contagem de <i>E. faecalis</i> (UFC/mL x 10 <sup>5</sup> ), antes e após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares	79
Tabela 9 - Contagem de <i>C. albicans</i> (UFC/mL x 10 <sup>5</sup> ), antes e após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares	80
Tabela 10 - Porcentagem de redução de UFC/mL após instrumentação em associação com diferentes soluções irrigadoras	81
Tabela 11 - Proporção de eliminação de micro-organismos por $\mu\text{m}^2$ de dentina radicular	81
Tabela 12 - Proporção de eliminação de micro-organismos por $\mu\text{m}^2$ de dentina radicular nos diferentes terços radiculares	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APG	Acesso ao patrimônio genético
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
cel	Célula
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CHX	Clorexidina
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS	Substância polimérica extracelular
eV	Elétron-volt
g	Gramma
h	Hora
HCIO	Ácido hipocloroso
IC	Isolado clínico
IR	Índice de retenção
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicoico
m	Metro

M	Massa molar
MCVL	Microscopia confocal de varredura à laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mN	Milínewton
nº	Número
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
SBA	Ágar Sabouraud Dextrose
SBR	Sulforrodamina B
SFB	Soro fetal bovino
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	<i>Total Growth Inhibition</i> – Inibição total do crescimento
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
v	Volume
VBNC	<i>Viable but nonculturable</i> – Viável mas não cultivável
G	Gauge
HeNe	Hélio-Neônio

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{m}^2$	Micrômetro quadrado
$\mu\text{L}$	Microlitro
$>$	Maior
$<$	Menor
$\%$	Por cento
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$\#$	Número



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
3 PROPOSIÇÃO	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	103
7 CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	138
ANEXO 2 – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	141

## 1 INTRODUÇÃO

Os maiores desafios do tratamento endodôntico incidem sobre o controle de infecção e domínio da anatomia dental interna. Os procedimentos endodônticos convencionais como preparo do canal radicular e medicação intracanal nem sempre são eficazes para promover a completa limpeza e desinfecção, isto devido à permanência de micro-organismos viáveis no sistema de canais radiculares e tecidos periapicais, comprometendo o sucesso do tratamento (Câmara et al., 2010).

Dentre estes micro-organismos resistentes, o mais encontrado é o *Enterococcus faecalis*, um coco Gram-positivo anaeróbio facultativo normalmente detectável em infecções endodônticas assintomáticas persistentes (Gomes et al., 2006; Zoletti et al., 2006). Esta bactéria tem a capacidade de competir com outros micro-organismos, invadir túbulos dentinários e resistir a períodos de privação nutricional (Sundqvist et al., 1998; Love, 2001; Stuart et al., 2006, Prabhakar et al., 2010). O *E. faecalis* está relacionado aos casos de infecção endodôntica persistente e de reinfecção, por resistir ao aumento de pH superior a pH 11,0 (McHugh et al., 2004). Estudos mostram que nem as substâncias irrigadoras utilizadas no tratamento endodôntico (Peters, et al., 1995) nem a medicação intracanal com hidróxido de cálcio (Evans et al., 2002) são capazes de atingir este valor de pH nos túbulos dentinários para eliminar esta bactéria.

Embora não sejam usualmente constituintes da infecção endodôntica primária, fungos também têm sido encontrados em casos de infecções secundárias ou persistentes, sendo a *Candida albicans* a levedura mais comumente isolada (Peciulienė et al., 2001), apresentando potencial para penetração nos túbulos dentinários (Sen et al., 1997; Siqueira et al., 2002).

Substâncias químicas auxiliares e soluções irrigadoras quando utilizadas em conjunto com instrumentos endodônticos irão eliminar micro-organismos e prevenir a infecção do canal radicular, além de atuarem como lubrificantes durante o preparo químico-mecânico (Kishen, 2012; Bourreau et al., 2015). A limpeza e desinfecção de áreas inacessíveis mecanicamente, como ramificações, istmos e túbulos dentinários, são confiadas inteiramente à atividade dos meios químicos (Haapasalo et al., 2010).

O hipoclorito de sódio é a solução mais utilizada como irrigante em Endodontia, por sua propriedade de dissolução de remanescentes de tecidos necróticos e amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo proporcional à sua concentração (Gomes et al., 2001; Berber et al., 2006). No entanto, já foram demonstrados alguns pontos desfavoráveis no emprego desta substância, como sua citotoxicidade (Pashley et al., 1985, Tanumaru-Filho et al., 2002), casos de alergia e sabor desagradável. Além disso, foi relatado seu efeito nocivo sobre a elasticidade e resistência flexural da dentina exposta a uma concentração elevada de hipoclorito a longo prazo (Sim et al., 2001; Pascon et al., 2009), e também prejuízo na adesão à dentina radicular por provocar alterações na estrutura do colágeno (Moreira et al., 2009).

Assim, são sugeridas outras opções de substâncias para serem utilizadas como irrigantes do sistema de canais radiculares. Dentre estas, o digluconato de clorexidina tem sido amplamente pesquisado devido sua comprovada atividade antimicrobiana, principalmente frente a bactérias Gram-positivas (Mohammadi e Abbott, 2009), e sua característica ímpar de apresentar substantividade. A liberação lenta e a atividade antimicrobiana residual foram confirmadas por diversos estudos (White et al., 1997; Komorowski et al., 2000; Khademi et al., 2006).

Do mesmo modo, compostos oriundos de espécies vegetais têm sido considerados como uma alternativa natural para utilização em endodontia. Os óleos essenciais produzidos por plantas medicinais e aromáticas apresentam ação antimicrobiana comprovada, além de serem matéria-prima de fácil obtenção no Brasil, devido à grande biodiversidade encontrada em um país tropical. Segundo Melo et al. (2015), os óleos essenciais são misturas de compostos lipossolúveis e voláteis que podem se difundir facilmente através das membranas celulares dos micro-organismos, afetando sua permeabilidade e a liberação de constituintes intracelulares. Além disso, podem interferir na função de transporte de elétrons da membrana, captação de nutrientes, atividade enzimática, síntese de proteínas e ácido nucléico (Henriques et al., 2014).

Estudos revelam a eficácia antimicrobiana de óleos essenciais de várias espécies contra diversas bactérias orais patogênicas (Hammer et al., 2003; Takarada et al., 2004; Botelho et al., 2007; Cha et al., 2007; Maggi et al., 2009; Galvão et al., 2012; Bersan et al., 2014; Lobo et al., 2014; Melo et al., 2015; Botelho et al., 2016;

Martin et al., 2016; Pereira et al., 2016) e atividade antifúngica, sobretudo contra a levedura *C. albicans* (Sartoratto et al., 2004; Duarte et al., 2005; Furletti et al., 2011; Sedigh-Shams et al., 2016).

Embora estes estudos demonstrem o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais contra patógenos orais, poucos tratam de seu uso contra infecções de origem endodôntica (Cavalcanti et al., 2011; Samadi et al., 2011; Thosar et al., 2013; Abbaszadegan et al., 2015; Łysakowska et al., 2015; Abbaszadegan et al., 2016). Neste sentido, não foi claramente demonstrado se estas soluções provenientes de produtos naturais apresentam potencial antimicrobiano para serem indicados como substância química auxiliar em endodontia.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre *E. faecalis* e *C. albicans* patógenos do canal radicular reconhecidos como resistentes aos procedimentos endodônticos. Os óleos de melhor atividade foram combinados e suas blendas avaliadas quanto às propriedades indispensáveis para caracterizar uma solução irrigadora, como ação antimicrobiana em canais radiculares e túbulos dentinários de dentes humanos extraídos, citotoxicidade e tensão superficial.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Infecção endodôntica

O principal objetivo do tratamento endodôntico é promover a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, de modo a oferecer condições para que o organismo restabeleça a normalidade dos tecidos periapicais, comprometidos devido a patologias da polpa dental. Tais condições são alcançadas por meio do preparo químico-mecânico e pela obturação dos canais radiculares, responsável pela manutenção desta desinfecção (Meneghini et al., 2012).

A eliminação ou a redução significativa de biofilme bacteriano, bem como a prevenção da recontaminação do canal radicular são os elementos essenciais para o sucesso após o tratamento endodôntico. No entanto, estudos clínicos têm demonstrado que, mesmo após meticuloso preparo biomecânico e obturação dos canais radiculares, as bactérias podem persistir nas porções não instrumentadas e complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (Siqueira e Roças, 2004; Nair et al., 2005; Vera et al., 2012).

As vias de reinfecção do canal radicular durante ou após a terapia endodôntica podem ser por microinfiltração coronária causada pela restauração temporária inadequada ou possivelmente por bactérias nos túbulos dentinários que podem se multiplicar quando o selamento coronário for inadequado. Uma vez que estas bactérias não estão acessíveis para eliminação pelos mecanismos de defesa do hospedeiro ou pela administração sistêmica de agentes antimicrobianos, métodos de desinfecção local do canal radicular continuarão sendo importantes adjuntos no tratamento de canal radicular de dentes com polpas necróticas (Oguntebi, 1994).

Com o progresso da infecção no espaço pulpar, as bactérias invadem os túbulos dentinários radiculares. O microambiente dos túbulos dentinários radiculares é anaeróbio, assim como em dentina coronária, favorecendo o crescimento de um grupo selecionado de bactérias anaeróbias estritas e facultativas (Oguntebi, 1994). Se estas bactérias não forem removidas ou eliminadas durante a terapia endodôntica, a presença de bactérias viáveis no interior da dentina radicular pode ser responsável

pela continuidade da infecção no canal radicular (Haapasalo e Orstavik, 1987) e pela periodontite apical persistente (Love, 2009).

Mais de 500 espécies bacterianas são reconhecidas como componentes da microbiota oral. No entanto, relativamente poucas espécies parecem ser capazes de invadir e infectar o espaço do canal radicular. Isto sugere que muitas espécies de bactérias orais não têm as propriedades necessárias para invadir túbulos e sobreviver no ambiente intratubular (Love e Jenkinson, 2002; Taschieri et al., 2014).

O suprimento nutricional no interior dos túbulos pode influenciar na profundidade de penetração bacteriana. Isto depende particularmente da patência do túbulo, permitindo a difusão de substâncias da cavidade oral, do fluido pulpar ou dos tecidos periapicais, sendo proporcional ao diâmetro dos túbulos. Isto pode explicar o maior número de bactérias cariogênicas presentes na dentina superficial, onde é provável que a presença de hidratos de carbono fermentáveis e oxigênio provenientes da cavidade oral seja maior do que em dentina mais profunda. Além disso, o ambiente anaeróbico e a possível presença de componentes do tecido, por exemplo, hemina, na dentina próximo da polpa pode favorecer o crescimento e sobrevivência de organismos, tais como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* (Love e Jenkinson, 2002).

Tem sido demonstrado que a invasão de túbulos dentinários e adesão ao colágeno por *Streptococcus mutans* ou *S. gordonii* foram inibidas por soro humano, sugerindo um mecanismo protetor do soro. Em contraste, as células de *E. faecalis* mantiveram sua capacidade de invadir dentina e aderir ao colágeno mesmo na presença de soro (Love, 2001). Sugere-se que, após a terapia do canal radicular, esta capacidade pode permitir que células residuais do *E. faecalis* em dentina radicular recolonizem o canal radicular obturado e tenham participação na falha crônica de dentes tratados endodonticamente.

Os fatores de virulência das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas exercem um papel fundamental na perpetuação da doença, uma vez que a infecção endodôntica é polimicrobiana. Enquanto as bactérias Gram-negativas contêm endotoxina em sua camada lipídica, ou lipopolissacarídeo (LPS), que lhes confere a propriedade de patogenicidade, as bactérias Gram-positivas possuem uma exotoxina composta pelo LTA (ácido lipoteicoico), que tem como característica principal a aderência a outras bactérias (Gomes et al., 2013).

Evidências apontam que a natureza das infecções endodônticas persistentes depende não somente da robustez dos micro-organismos do local infectado, mas também da capacidade em adaptar sua fisiologia às novas condições ambientais estabelecidas após o tratamento endodôntico. As alterações no ambiente, tais como o aumento do pH por hidróxido de cálcio ou o efeito de agentes antimicrobianos, são capazes de desencadear cascatas genéticas que modificam as características fisiológicas das células bacterianas (Chávez de Paz, 2007). Os micro-organismos anaeróbios facultativos podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa taxa metabólica por um período de tempo, mas mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, podem levar a ativação destes micro-organismos e consequente proliferação dos mesmos (Molander et al., 1998).

Para a bactéria ser detectada em amostras pós-tratamento endodôntico, esta deve resistir aos processos de desinfecção intracanal e se adaptar ao ambiente drasticamente alterado (Siqueira e Roças, 2008). Há vários mecanismos diferentes utilizados pelas bactérias para permitir a sua adaptação ao ambiente, sendo estes a formação de biofilme, modificação fisiológica, resposta ao estresse e a criação de subpopulações de células juntamente com vários mecanismos que envolvem a troca de material genético entre as bactérias. A exploração destes mecanismos pode ajudar na compreensão da sobrevivência bacteriana em ambientes limitantes, tais como o encontrado no canal radicular.

Alguns autores justificam o tratamento endodôntico em sessão única argumentando que as bactérias residuais sobreviventes à terapia seriam sepultadas pela obturação do sistema de canais radiculares e pereceriam por falta de fonte de nutrientes (Peters et al., 1995). Este argumento poderia ser válido para bactérias remanescentes nas paredes intocadas no canal radicular ou no interior dos túbulos dentinários (Siqueira e Roças, 2008). No entanto, as bactérias remanescentes na porção mais apical do canal radicular, em ramificações apicais ou em canais laterais podem manter a infecção a longo prazo, por estarem em contato direto com os tecidos perirradiculares, que são fontes sustentáveis de nutrientes. Além disso, o simples fato de que as bactérias podem ser encontradas no canal radicular principal em muitos casos de infecção pós-tratamento (Siqueira e Roças, 2004) indica que esse sepultamento não é confiável. Até mesmo bactérias enclausuradas no canal radicular

pela obturação podem derivar nutrientes de detritos e restos teciduais até que uma fonte mais sustentável de nutrientes seja estabelecida (Vera et al., 2012).

## 2.2 Biofilme endodôntico

A etiologia bacteriana foi confirmada para as doenças orais como cárie, doença periodontal e infecção endodôntica. As bactérias que causam estas doenças são organizadas em estruturas de biofilme, que são complexas comunidades microbianas compostas por uma grande variedade de bactérias com diferentes necessidades ecológicas e potencial patogênico. O biofilme oferece proteção eficaz às bactérias, não somente contra o sistema de defesa do hospedeiro, mas também os torna mais resistentes aos agentes de desinfecção utilizados como produtos de higiene ou no tratamento de infecções. Foi demonstrado que bactérias em biofilme são 100 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes bacterianos do que seus homólogos planctônicos (Stojicic et al., 2013).

A formação do biofilme consiste na organização dos micro-organismos em estruturas ligadas umas às outras e/ou às paredes do canal radicular, muitas vezes envolvendo um grande número de espécies (Costerton et al., 1999; Chávez de Paz et al., 2007, 2010).

Os conceitos atuais enfatizam a doença endodôntica como um exemplo de infecção mediada por biofilme. Ricucci e Siqueira (2010) revelaram uma prevalência muito alta de biofilme bacteriano em terços apicais de canais radiculares tratados e não tratados endodonticamente com periodontite apical associada.

Assim, a fisiologia de uma bactéria em cultura planctônica é intensamente diferente daquela do mesmo organismo crescendo em uma superfície de biofilme. Neste contexto, os estudos sobre infecções endodônticas incluem biofilmes formados por culturas mistas de bactérias anaeróbicas em dentes extraídos (Clegg et al., 2006) e por culturas puras de *E. faecalis* (Dunavant et al., 2006). Além disso, Chávez da Paz et al. (2007) testaram a tolerância alcalina das espécies isoladas de canais radiculares infectados cronicamente e encontraram que *E. faecalis* e outras bactérias Gram-positivas, tais como *Lactobacillus paracasei*, *Olsenella uli*, ou *S. gordonii*, compartilham a tolerância alcalina igualmente elevada quando crescendo em



condições planctônicas. *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus oralis* e *Fusobacterium nucleatum*, por outro lado, foram muito afetados pelo estresse alcalino. O importante, no entanto, foi a observação de que esta diferença de tolerância alcalina não foi aparente quando as espécies foram testadas em biofilmes porque todas as cepas mostraram uma alta tolerância ao pH alcalino. Essas descobertas não apenas mostram a capacidade de bactérias do canal radicular diferentes do *E. faecalis* se adaptarem ao estresse alcalino, mas também proporcionar mais evidência de que as bactérias em biofilme aderido à superfície são mais resistentes ao estresse ambiental do que quando cultivadas em cultura líquida.

A adesão é considerada como o primeiro passo para colonização bacteriana do tecido do hospedeiro, incluindo a adesão e invasão de túbulos dentinários, sendo mediada por componentes específicos da superfície celular bacteriana (adesinas). Foi mostrado que a proteína de ligação ao colágeno promove a adesão do *E. faecalis* à matriz extracelular de algumas proteínas, incluindo colágeno tipo I. Como este colágeno é o principal componente orgânico da dentina, é considerado como um dos principais substratos para a ligação de *E. faecalis* à dentina (Chivatxaranukul et al., 2008).

Os biofilmes formados em canais radiculares possuem as mesmas propriedades que as comunidades que colonizam as superfícies do esmalte e do cimento. Os biofilmes se formam quando bactérias planctônicas numa fase líquida natural são depositadas sobre uma superfície contendo uma matriz polimérica orgânica. A formação do biofilme em canais radiculares, como sugerida por Svensäter e Bergenholtz (2004), é provavelmente iniciada em algum momento depois da primeira invasão da câmara pulpar por organismos orais planctônicos após a degradação dos tecidos dentinários. Neste ponto, a lesão inflamatória se move sucessivamente em direção ao ápice radicular, onde este irá fornecer o veículo fluido para os organismos planctônicos que estarão invadindo este espaço, onde poderão se multiplicar e continuar aderindo às paredes do canal radicular (Nair et al., 2005).

Um biofilme bacteriano maduro é composto por múltiplas camadas de bactérias incorporadas em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS). O EPS com sua estrutura altamente entrelaçada impede a penetração de agentes antimicrobianos, formando uma barreira reforçada por substâncias extracelulares e enzimas retidas na matriz (Kishen, 2012). Este arranjo espacial irá expor as células

das camadas mais profundas do biofilme à menos nutrientes do que as células na superfície. Uma vez que o grau de nutrientes e gases gradientes aumentam com a espessura e a maturidade do biofilme, a influência da taxa de crescimento e de oxigênio sobre a resistência antimicrobiana é particularmente marcada em biofilme envelhecido. A resistência também está relacionada com o crescimento lento e adaptação à restrição de nutrientes desempenhados pelas células bacterianas residentes num biofilme maduro.

Além disso, como em todos os microambientes naturais, a capacidade de adaptação dos organismos individuais é exponencialmente aumentada quando crescendo em comunidades de biofilme, sendo este conceito incluído na etiologia de infecções endodônticas persistentes. A base para esta abordagem ecológica sugere que o mais perigoso "patógeno" não é uma espécie individual, mas uma entidade polimicrobiana que sofre alterações fisiológicas e genéticas, desencadeadas por alterações ambientais no canal radicular (Chávez da Paz, 2007).

Existem ainda evidências de que organismos estruturados em um biofilme apresentam potencial patogênico maior do que os micro-organismos em estado planctônico. Algumas espécies bacterianas podem se apresentar mais virulentas quando organizadas em biofilme, além de se apresentarem mais resistentes aos agentes antimicrobianos (Costerton et al., 1999). Esta característica de organização em comunidade proporciona uma série de vantagens às bactérias do biofilme, incluindo o aumento da diversidade e eficiência metabólicas devido à proteção da cadeia alimentar, a proteção contra a competição microbiana, defesas do hospedeiro, agentes antimicrobianos e estresse ambiental, facilitando o intercâmbio genético e reforçando a patogenicidade (Siqueira e Roças, 2009).

Independente se a necrose for recente ou se houve tempo suficiente para a formação de lesão periapical, o tratamento endodôntico consiste na limpeza do substrato orgânico e do biofilme das paredes do canal radicular, em istmos e reentrâncias, na modelagem cônica do canal, principalmente do terço apical, e no selamento tridimensional deste espaço preparado (Gomes, 2015). Estas áreas geralmente são de difícil limpeza e não são facilmente acessíveis às soluções antimicrobianas.

Uma intensa penetração bacteriana a cerca de 300 µm de profundidade no interior dos túbulos dentinários tem sido relatada, sendo que a espécie *E. faecalis*

pode penetrar ainda mais profundamente ( $>500\text{ }\mu\text{m}$ ) (Haapasalo e Orstavik, 1987). Estudos sobre penetração de bactérias nos túbulos dentinários foram feitos por exame histológico, muitas vezes depois de procedimentos de fixação e coloração Brown e Brenn (Vera et al., 2012; Vieira et al., 2012). Outro método utiliza cultura das raspas de dentina obtidas por desgaste sequencial no lado pulpar do canal infectado para quantificar bactérias cultiváveis (Berber et al., 2006). Estes métodos são capazes de demonstrar a existência de bactérias, porém não há informações sobre a distribuição e a viabilidade das bactérias presentes. Bactérias mortas por um irrigante podem se difundir para dentro dos túbulos dentinários e não seriam detectadas por estes métodos (Wong e Cheung, 2014).

O desenvolvimento de modelos de múltiplas espécies em biofilme é necessário para explicar as interações que ocorrem em biofilmes dos canais radiculares durante a periodontite apical. No estudo de Chávez da Paz (2012), as quatro espécies testadas *Actinomyces naeslundii*, *L. salivarius*, *S. gordonii* e *E. faecalis* foram capazes de formar biofilme em comunidades estáveis e reprodutíveis. Uma elevada proporção de células viáveis ( $>90\%$ ) foi observada e o crescimento de biofilme foi correlacionado com a elevada atividade metabólica das células.

Nesse contexto, o reconhecimento do biofilme como uma forma de defesa e resistência dos micro-organismos não pode ser negligenciado quanto ao seu potencial patogênico e deve nortear a escolha dos agentes antimicrobianos utilizados na irrigação dos canais radiculares.

### **2.3 *Enterococcus faecalis***

Os *enterococcus* podem ser patógenos oportunistas e são associados a infecções em uma variedade de sítios do corpo humano, como trato geniturinário, endocárdio, abdômen e canal biliar. As espécies de maior importância clínica são *E. faecalis* e *E. faecium* (Gomes et al., 2013).

São organismos comensais com potencial patogênico, apresentam a capacidade de deslocar-se através da barreira intestinal até alcançar a corrente sanguínea, sendo este um dos principais meios pelos quais se espalham para outros sítios distantes do corpo. Tal habilidade pode ser atribuída à capacidade de produção

de polissacarídeo extracelular por parte da célula bacteriana. A espécie *E. faecalis* em especial pode estar ligada aos casos de endocardite bacteriana em uma significativa proporção de 5 a 20% dos casos (Hardie e Whiley, 1997).

O tratamento endodôntico pode selecionar espécies resistentes aos procedimentos de desinfecção, por promover um ambiente escasso de nutrientes, onde micro-organismos capazes de permanecer em fase latente têm a chance de persistirem no sistema de canais radiculares após o tratamento. Também há a possibilidade destes micro-organismos penetrarem no canal radicular devido a um isolamento inadequado do campo operatório, infiltração através do material restaurador temporário ou quando o canal é deixado aberto à cavidade oral (Siren et al., 1997; Waltimo et al., 1997).

O *E. faecalis* é a espécie mais comumente encontrada em canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com infecção apical persistente (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Siqueira e Roças, 2004; Gomes et al., 2008). A presença desta bactéria pode ser interpretada como como um fator de risco para lesão persistente. O reconhecimento frequente de *E. faecalis* em canais radiculares associada a infecções crônicas persistentes provocou intenso interesse em pesquisas com esta bactéria. O *E. faecalis* tornou-se o organismo ideal para se testar *ex vivo* diferentes irrigantes, medicamentos e soluções antissépticas utilizados em endodontia, com resultados que revelaram a sua capacidade de resistência inata (Chávez de Paz, 2007).

Estudo de Chivatxaranukul et al. (2008) confirmou a invasão de túbulos dentinários por *E. faecalis*, sendo que a profundidade da penetração na dentina foi um pouco maior do que já relatado em amostras clínicas com lesões periapicais, que variaram entre 10 e 150  $\mu\text{m}$  (Sen et al., 1995).

Estes fatos indicam que o *E. faecalis* exerce um papel patogênico nos insucessos de tratamentos endodônticos. Love (2001) verificou que a capacidade das células do *E. faecalis* em causar doença periapical em um dente tratado endodonticamente pode depender da competência das mesmas em invadir túbulos dentinários e permanecerem viáveis em seu interior. Os resultados deste estudo demonstraram que as células desta bactéria permanecem viáveis, mantêm a capacidade de invadir túbulos dentinários e aderem ao colágeno na presença de soro humano. Os túbulos dentinários além de servirem para a manutenção da doença

periapical, como depósitos bacterianos, podem ser considerados uma das principais vias de contaminação pulpar quando expostos às bactérias do meio oral, principalmente após a perda de esmalte ou de cimento.

Figdor et al. (2003) relataram que *E. faecalis* tem a capacidade de sobreviver em ambientes com escassez de nutrientes e progredir quando a fonte de nutrientes é restabelecida. Em um estudo *ex vivo*, Sedgley et al. (2005) mostraram que o *E. faecalis* tem a capacidade de se recuperar após um estado de restrição nutricional prolongada em dentes tratados endodonticamente. Quando inoculada no sistema de canais radiculares, esta bactéria mantém sua viabilidade por 12 meses sem nutrientes adicionais. Assim, *E. faecalis* viável mesmo sepultado pela obturação do canal radicular pode proporcionar um reservatório a longo prazo para a infecção subsequente.

Entre os fatores de virulência envolvidos no mecanismo de ação do *E. faecalis*, estão a capacidade de produção de citolisina, enzima com atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos; a presença de cápsula, atribuindo maior resistência à fagocitose; a produção de adesinas, o que beneficia a adesão microbiana ao epitélio por meio de ligação com receptores das células eucarióticas; e a produção da gelatinase, uma endopeptidase que cliva peptídeos ativos, como a caseína e a hemoglobina (Gomes et al., 2013).

Soma-se a estas particularidades, a habilidade do *E. faecalis* sobreviver em pH elevado (acima de 11,5), como aquele proporcionado pelas pastas de hidróxido de cálcio como medicação intracanal (Haapasalo e Orstavik, 1987). Esta resistência ocorre provavelmente por sua capacidade em regular internamente o pH com uma eficiente bomba de prótons, mantendo o citoplasma em pH neutro (Evans et al., 2002).

Zoletti et al. (2006) compararam dois métodos de identificação de *E. faecalis*, cultura e PCR, e asseguraram a superioridade do método molecular. Os autores afirmaram que a alta prevalência de *E. faecalis* detectada pelo PCR ocorreu devido à vantagem deste método em detectar DNA de células não viáveis. Entretanto, existe a possibilidade de que as células não viáveis sejam atacadas por outras bactérias e fungos, e que oxidação e hidrólise venham a danificar o DNA, causando perdas irreversíveis na sequência de informação. Algumas cepas bacterianas podem estar viáveis, mas não cultiváveis (VBNC – viáveis, mas não cultiváveis), desenvolvendo uma estratégia de sobrevivência quando submetidas a condições

ambientais adversas, como falta de nutrientes. Nestas condições, o micro-organismo não pode ser detectado pelo método de cultura, mas continua viável, sendo o método molecular mais indicado para sua identificação.

*E. faecalis* foi mais resistente à restrição nutricional quando em coexistência com *C. albicans*, *S. gordonii*, *Actinomyces viscosus* ou *L. acidophilus*, formando biofilmes mais espessos e mais densos (Gao et al., 2016). Assim, a comunidade multiespécies é propícia para a resistência do *E. faecalis* e a formação de biofilme em canais radiculares.

## **2.4 *Candida albicans***

*Candida albicans* é um micro-organismo encontrado na cavidade oral e comumente isolado de dentes com necrose pulpar, estando também associado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Najzar-Fleger et al., 1969; Nair et al., 1990; Waltimo et al., 1997; Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001). Assim, além de bactérias, leveduras podem ser detectadas em 7 a 18% dos canais radiculares infectados, sendo comumente associadas com casos persistentes de periodontite apical (Waltimo et al., 2000). *C. albicans* é a levedura mais comum isolada dos canais radiculares, tanto nas infecções endodônticas primárias (Baumgartner et al., 2000; Egan et al., 2002) quanto nas secundárias (Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Siqueira et al., 2002; Siqueira e Sen, 2004).

Estudos pioneiros, como o de Najzar-Fleger et al. (1969) constataram a prevalência de espécies do gênero *Candida* em diferentes locais da cavidade oral, e que este estava presente em 55% dos canais radiculares. Também Nair et al. (1990) identificaram a presença de bactérias e fungos em canais radiculares obturados com lesão periapical persistente. Foram analisados os terços apicais de nove casos clínicos utilizando microscopia ótica e eletrônica de transmissão. Dois espécimes revelaram micro-organismos semelhantes a leveduras no canal radicular e no forame apical. Foram observadas inúmeras leveduras em brotamento, indicando um estado de proliferação ativa. Waltimo et al. (1997) analisaram os micro-organismos dos canais radiculares de dentes com lesão apical, isolando um total de 48 espécies de fungos, sendo que a espécie mais comumente encontrada foi *C. albicans*, que em

87% dos casos apresentava-se em forma de culturas associadas a outras bactérias, e em apenas 13% dos casos eram culturas isoladas. No entanto, os mecanismos de virulência que poderiam levar à colonização do canal radicular por *C. albicans* têm sido estudados mais recentemente; dentre estes está a atividade colagenolítica que pode possibilitar a este fungo a utilização da dentina como fonte de nutriente (Ferguson et al., 2002).

A presença de *C. albicans* em lesões endodônticas foi avaliada a partir de cultura, métodos moleculares e microscopia eletrônica por Baumgartner et al. (2000). Os autores também verificaram que o tratamento endodôntico pode induzir as bactérias a um estado "viável, mas não cultivável" (VBNC) durante o qual cessa o crescimento, mas os micro-organismos permanecem viáveis. Leveduras também são capazes de induzir um estado VBNC. Quando as condições favoráveis são restabelecidas, os micro-organismos podem voltar ao estado cultivável. Entre os vários métodos para identificar bactérias no estado VBNC, a análise de fluorescência é usada comumente com técnicas de coloração de células vitais para determinar o perfil de viabilidade, arquitetura e distribuição espacial em biofilmes microbianos (Delgado et al., 2013).

Peciulienė et al. (2001) relataram a prevalência de *C. albicans* em dentes obturados com periodontite apical crônica como sendo de 18%. Bacilos entéricos Gram-negativos como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* estavam presentes em três casos. *Enterococcus spp.* identificadas como *E. faecalis*, estavam presentes em 21 canais (64% das culturas positivas), sendo o principal ou o único componente da microbiota em 19 casos.

Siqueira e Roças (2004) avaliaram amostras coletadas de 22 canais radiculares obturados com lesão perirradicular persistente por análise em PCR. Enquanto *E. faecalis* foi a espécie bacteriana mais prevalente (77%), *C. albicans* foi isolada em 9% das amostras.

Ao contrário das bactérias que são procariontes, os fungos são organismos eucariontes (Love, 2009). A incidência de leveduras em infecções endodônticas persistentes é relatada entre 2,9 a 22,2% (Hasan e Baksi, 2009). Leveduras são isoladas tanto em culturas puras quanto em conjunto com outras bactérias nos casos resistentes à terapia endodôntica (Siren et al., 1997; Waltimo et al., 1997; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Siqueira e Roças, 2004). Pinheiro et al. (2003),

relataram significativa associação entre dentes não selados coronariamente e *Candida spp.* Egan et al. (2002) relataram que a presença de fungos nos canais radiculares estava associada com a sua presença na saliva e que houve alguma comunicação dos canais radiculares com o meio oral, através de infiltrações coronárias ou fístulas, nos casos onde fungos foram isolados.

Ruff et al. (2006) avaliaram o efeito antifúngico de várias soluções como irrigação final contra biofilmes de *C. albicans*. Com um minuto de aplicação, o hipoclorito de sódio 6% não destruiu todas as células fúngicas, mas reduziu consideravelmente seu potencial de crescimento, de  $100 \times 10^3$  para  $0,1 \times 10^3$ .

Segundo Chandra et al. (2001), a formação do biofilme em espécies de *C. albicans* se dá por adesão de uma camada de células flutuantes leveduriformes a uma superfície e sobre estas uma camada de formas filamentosas rodeadas por uma matriz de polissacarídeos. O material extracelular produzido por esta espécie contém carboidratos, proteínas e outros componentes ainda desconhecidos, sendo esta composição diferente das células não aderidas (planctônicas) e muito mais forte e estável quando o biofilme se desenvolve em meio aquoso, tendo uma resistência muito alta às drogas terapêuticas.

## **2.5 Irrigação em endodontia**

O sistema de canais radiculares é composto pelo canal principal e suas ramificações. Entre estas estão os canais laterais, secundários, acessórios, colaterais, recorrentes, intercanais e deltas apicais, que caracterizam uma complexa microconfiguração anatômica dificilmente visualizada na radiografia de diagnóstico ou acessada por instrumentos endodônticos para preparo mecânico (Rodrigues et al., 2012). Por essas razões deve ser enfatizada a importância das substâncias químicas auxiliares na limpeza e desinfecção dessas áreas não atingidas pelos instrumentos, uma vez que a limpeza e remoção de tecidos necróticos, detritos e biofilmes de áreas intocadas são atribuídos inteiramente aos meios químicos. Assim, o sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado à completa sanificação e selamento do sistema de canais radiculares. Também é conhecido que as áreas de



anastomoses do canal radicular, intocadas pelos instrumentos, ficam repletas de detritos durante a instrumentação (Paqué et al., 2009).

O procedimento de irrigação dos canais radiculares é mais efetivo em áreas acessíveis aos instrumentos endodônticos, pois a agulha de irrigação pode seguir o caminho criado pela instrumentação (Haapasalo et al., 2010). Contudo, a solução química auxiliar é o principal responsável pela ação sobre micro-organismos presentes em complexidades anatômicas e túbulos dentinários, áreas inacessíveis à ação mecânica dos instrumentos (Kishen, 2012).

Durante e após a instrumentação do canal radicular, as substâncias químicas auxiliares devem facilitar a remoção de resíduos de tecidos, raspas de dentina e micro-organismos, caracterizando um mecanismo de “lavagem” do sistema de canais radiculares. Os irrigantes também ajudam a evitar a compactação apical de tecidos que foram excisados, prevenindo assim a extrusão de material contaminado para a região periapical. Segundo Haapasalo et al. (2010), o irrigante ideal deve apresentar as seguintes características:

- Ação de limpeza, que auxilia na remoção de detritos;
- Reduzir a fricção do instrumento durante o preparo, agindo como lubrificante;
- Facilitar a remoção da dentina excisada;
- Dissolver o material orgânico, como colágeno da dentina, tecido pulpar e biofilme, bem como tecido inorgânico (dentina);
- Penetrar em toda extensão radicular;
- Eliminar as bactérias e leveduras, incluindo biofilme;
- Não irritar ou danificar o tecido periapical vital e não ter efeitos cáusticos ou citotóxicos;
- Não enfraquecer nem manchar a estrutura dentária.

A ação mecânica de instrumentos com substâncias inertes pode ser eficiente quanto à limpeza, porém não é o suficiente para atingir um nível de desinfecção significativa (Byström e Sundqvist, 1981). Assim, é necessária a utilização

de uma substância com poder antimicrobiano e capaz de promover limpeza adequada em áreas de difícil acesso.

A eficácia da irrigação, definida como a remoção de detritos e de eliminação de bactérias, depende do diâmetro do canal radicular, da profundidade de penetração da agulha de irrigação, da pressão de irrigação e das propriedades físico-químicas da solução irrigadora (Mohammadi et al., 2014).

Zehnder (2006) afirmou que a substância química auxiliar ideal deve ter amplo espectro e alta eficácia contra micro-organismos organizados em biofilme, inativar endotoxinas e prevenir a formação de *smear layer* (camada de lama dentinária) durante a instrumentação, ou ser capaz de dissolvê-la uma vez formada. Além disso, os irrigantes também devem ter uma baixa tensão superficial e um pequeno coeficiente de viscosidade, permitindo um melhor escoamento e penetração nas anfractuosidades e reentrâncias das paredes do canal radicular. Isso é favorecido pelo maior alcance do jato e um melhor refluxo do líquido em direção coronária, permitindo uma maior efetividade de limpeza.

Segundo Haapasalo et al. (2010), nenhuma substância química disponível até o momento atual é capaz de deter todas as características de um irrigante ideal, sem apresentar propriedades prejudiciais aos tecidos vitais. Evidências científicas até o momento apontam o hipoclorito de sódio como sendo o padrão-ouro para os irrigantes endodônticos, por ser o único capaz de dissolver tecido orgânico, incluindo a parte orgânica da *smear layer* e do biofilme microbiano.

## 2.6 Hipoclorito de sódio

A solução de hipoclorito de sódio apresenta um equilíbrio dinâmico, onde pode apresentar-se como um sal não-dissociado, dando origem a outras substâncias ou apresentar-se totalmente dissociado. Ao entrar em contato com material orgânico, o hidróxido de sódio (NaOH) presente na solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) reage com ácidos graxos, transformando-os em sabão e glicerol. A presença de sabão reduz a tensão superficial do restante da solução (Spanó et al., 2001). Simultaneamente, NaOH neutraliza aminoácidos, resultando em sal e água. O ácido hipocloroso (HClO) quando entra em contato com a matéria orgânica, age como

solvente liberando cloro, que se combina com o grupamento amina das proteínas formando o composto cloroamina. Esse composto interfere no metabolismo celular bacteriano, pois o cloro é um potente agente oxidante, uma vez que inibe a ação de enzimas bacterianas, através da oxidação de grupos sulfidrilas das enzimas essenciais para as bactérias (Estrela et al., 2002).

As atividades antimicrobiana e solvente do hipoclorito de sódio dependem da concentração da solução química. Soluções de hipoclorito de sódio mais concentradas apresentam maior atividade antimicrobiana. Da mesma forma, quanto maior a concentração da solução, mais rápida é a dissolução tecidual (Gomes et al., 2001). Porém, o aumento da concentração do hipoclorito leva também a um aumento de sua citotoxicidade, redução no módulo de elasticidade da dentina e resistência flexural da dentina devido a sua ação proteolítica (Sim et al., 2001; Marending et al., 2007). O hipoclorito de sódio na concentração 5,25% apresentou um efeito tóxico ao tecido conjuntivo e por isso não pode ser considerado como um irrigante ideal, principalmente quando se compara com outros agentes químicos com propriedades favoráveis, como a biocompatibilidade (Gomes-Filho et al., 2008). Além disso, mostrou interferir no substrato dentinário (colágeno da matriz orgânica da dentina), prejudicando a adesão e formação da camada híbrida (Moreira et al., 2009), já que a integridade da estrutura dentinária é importante durante a fase de hibridização dos sistemas adesivos.

A ação antimicrobiana do hipoclorito no biofilme endodôntico é influenciada pela concentração da substância, tempo de contato e micro-organismos envolvidos na infecção (Clegg et al., 2006).

A extrusão do hipoclorito de sódio para além do forame apical pode causar irritação grave ao tecido do periodonto apical, com posterior necrose tecidual, devido sua ação deletéria sobre o tecido conjuntivo. As sequelas imediatas deste tipo de acidente incluem dor severa, edema, hemorragia tanto intertecidual como através da abertura coronária, podendo evoluir com vários dias de edema crescente a equimose, acompanhado por tecido necrótico e, em alguns casos, infecção secundária. A maioria dos casos mostra resolução total em 15 dias, enquanto outros são marcados por longo prazo para a cura, com parestesias e cicatrizes (Ehrich et al., 1993).

## 2.7 Clorexidina

Das substâncias alternativas ao hipoclorito de sódio, a clorexidina (CHX) é a que apresenta melhores propriedades físicas e químicas e que preenche o maior número de requisitos para sua utilização como substância química auxiliar. É considerada um composto halogenado, uma vez que em sua constituição molecular contém o elemento cloro que pertence, na tabela periódica, à família dos halogênios. Em Odontologia é utilizada nas concentrações que variam de 0,12 a 2%, podendo ser em solução ou gel. A CHX é uma substância incolor e inodora com maior estabilidade de pH 5,0 a pH 8,0 e maior poder antimicrobiano entre pH 5,5 e pH 7,0. É um detergente catiônico sintético da classe das bisbiguanidas, sendo uma base forte e estável quando na forma de sal. Tem ação antimicrobiana, tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, sendo mais eficaz contra Gram-positivas, tendo efeito comprovado sobre *E. faecalis* (Freire e Soares, 2012).

A CHX é uma molécula hidrofóbica e lipofílica, que interage com lipopolissacárideos e fosfolípidios da membrana celular bacteriana. Os efeitos benéficos de CHX são devidos à interação da sua carga positiva com o fosfato carregado negativamente de paredes celulares das bactérias e sua capacidade para alterar o equilíbrio osmótico de células bacterianas. Isto pode aumentar a permeabilidade da parede celular e permitir a CHX penetrar na célula. Em altas concentrações ( $\geq 2\%$ ), CHX é um bactericida, uma vez que provoca a precipitação do conteúdo citoplasmático; numa concentração mais baixa (0,2%) promove a saída de fósforo e potássio para fora da célula (Mohammadi et al., 2014).

A característica ímpar da clorexidina é sua substantividade. Lenet et al. (2000) evidenciaram em seu trabalho que quando a clorexidina foi aplicada por um período de 7 dias como medicação intracanal apresentou um efeito residual por 21 dias. Leonardo et al. (1999) relataram a capacidade desta substância aderir à superfície dentinária e ainda ser encontrado seu efeito após 48 horas. Já Khademi et al. (2006) observaram que a aplicação da clorexidina 2% por 5 minutos induz um efeito residual por até 4 semanas. O efeito antimicrobiano a longo prazo da clorexidina também foi comprovado por Dametto et al. (2005) comparando o hipoclorito a 5,25% e clorexidina gel e solução ambas a 2% e, como controle, soro fisiológico e natrosol. Resultados mostraram que os grupos controle e hipoclorito apresentaram crescimento

bacteriano após 7 dias, o que não ocorreu com os grupos da clorexidina, tanto gel quanto solução.

Em estudo realizado por Bashetty e Hedge (2010) em que empregaram o hipoclorito a 5,25% e clorexidina gel a 2% para avaliar o grau de dor pós-operatória, foi verificado que o grupo hipoclorito houve maior índice de dor nas primeiras seis horas de pós-operatório, porém após 24 horas não houve diferença estatística.

A clorexidina em gel, tendo como espessante o polímero hidroxietilcelulose (natrosol) quanto submetida à tensão de cisalhamento provocada pelos instrumentos rotatórios ou reciprocantes e deixada por determinado período no interior dos canais, sofre o fenômeno de tixotropia. De um estado menos fluido (gel) passa para um estado de menor viscosidade (sol), portanto de maior fluidez, incorporando resíduos em sua massa. Sequencialmente, volta a se reestruturar como em seu estado original quando removida a tensão. Caracterizada a tixotropia, verifica-se a presença de resíduos incorporados na massa geleificada, impedindo que estes se acumulem no interior do canal ou nas paredes dentinárias. Este fenômeno foi observado em MEV por Ferraz et al. (2001), onde houve menor formação de *smear layer* nas paredes dentinárias quando instrumentadas com gel de clorexidina. Além disso, preserva a estrutura dentinária, o colágeno e a hidroxiapatita, já que é um agente antioxidante e melhora a força de adesão dos materiais restauradores (Moreira et al., 2009).

## 2.8 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas de metabólitos secundários obtidos da fração volátil de plantas por processo de hidrodestilação ou arraste a vapor. O termo essencial deriva de “essência”, o que significa cheiro ou sabor, e se relaciona com a propriedade destas substâncias de conferir sabores e odores específicos, principalmente para algumas plantas medicinais e aromáticas. Os óleos essenciais são caracterizados por apresentarem uma composição muito diversa, derivada principalmente de dois grupos, os terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Calsamiglia et al., 2007).

Os terpenos são hidrocarbonetos que são formados através da combinação de várias unidades de isopreno e são sintetizados dentro do citoplasma da célula

vegetal. Contêm uma estrutura hidrocarbonada rearranjada numa estrutura cíclica por ciclases. Os terpenos mais comuns são monoterpenos e sesquiterpenos, mas cadeias mais longas, tais como diterpenos, triterpenos e assim por diante, também estão presentes na célula vegetal (Nazzaro et al., 2013). Já os terpenóides são terpenos com moléculas de oxigênio adicionadas, ou que tiveram o seu grupo metila movido ou removido por enzimas específicas. Timol, carvacrol, linalol, mentol, geraniol, acetato de linalila, citronelal e piperitona são os terpenóides mais comuns e mais conhecidos (Nazzaro et al., 2013).

Tais compostos podem se difundir através das membranas celulares, sendo uma grande vantagem para a interações com as organelas intracelulares (Edris, 2007). Além disso, a sinergia nas interações entre os componentes presentes nos óleos essenciais é possível e pode potencializar suas atividades.

Algumas atividades farmacológicas foram atribuídas aos óleos essenciais, sendo as principais a antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, anti-helmíntica, antiparasitária, analgésica, sedativa, antitumoral, entre outras (Henriques et al., 2014).

Na literatura, dois possíveis mecanismos de ação têm sido propostos para explicar as atividades biológicas de óleos essenciais. Ambos os mecanismos são associados com a hidrofobicidade dos monoterpenos e sesquiterpenos, que muitas vezes são os principais produtos químicos dos mesmos. A hidrofobicidade de terpenóides permitiria a estes compostos permear as membranas celulares facilmente, portanto, causando a morte dos micro-organismos por afetar a suas organelas metabólicas. No entanto, considerando o grande número de componentes químicos e interações sinérgicas ou antagonistas entre estes constituintes, os óleos essenciais podem também agir excepcionalmente sobre alvos das membranas celulares, tais como lipídios e proteínas (Melo et al., 2015).

De acordo com alguns autores, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação dos óleos essenciais, por sua membrana celular facilitar a penetração de compostos hidrofóbicos. Entretanto, bactérias Gram-negativas apresentam membrana celular altamente hidrofílica formada por cadeias de polissacarídeos que atuam como uma barreira para a entrada de óleos essenciais hidrofóbicos, justificando sua maior resistência (Ennajar et al., 2010; Nazzaro et al., 2013). Contudo, mais investigações são ainda necessárias para estabelecer como os

componentes interagem para obter a atividade antimicrobiana (Gazim et al., 2010). Assim, é conhecido que as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à ação dos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas, assim como descrito por Mayaud et al. (2008) para o óleo de *Cymbopogon martinii*. Contrariamente a isto, Lodhia et al. (2009) relataram que o óleo essencial de *C. martinii* mostrou igual competência contra bactérias Gram-positivas, assim como bactérias Gram-negativas. Da mesma forma, Helander et al. (1998) constataram que os óleos essenciais foram capazes de penetrar na membrana de bactérias Gram-negativas, apesar de sua insolubilidade em água.

Hammer et al. (2003) avaliaram a atividade *in vitro* do óleo de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) contra 161 isolados clínicos de bactérias orais, pertencentes a quinze gêneros. Os menores valores de concentração inibitória mínima foram encontrados para *Prevotella* spp., *Porphyromonas*, *P. intermedia* e *Veillonella* com CIM de até 0,1 % (v/v). O óleo ainda reduziu o tempo de reprodução (*time kill*) de *S. mutans* e *Lactobacillus rhamnosus*. Assim, estes dados sugerem que uma grande proporção das bactérias orais é suscetível ao óleo essencial estudado.

Takarada et al. (2004) pesquisaram os efeitos antibacterianos de óleos essenciais sobre as bactérias orais *P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Foram determinadas as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas dos óleos essenciais das espécies *Leptospermum scoparium*, *M. alternifolia*, *Eucalyptus radiata*, *Lavandula officinalis* e *Rosmarinus officinalis*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi apresentada pelo óleo de *L. scoparium*, sendo também capaz inibir as bactérias periodontopatogênicas por completo, juntamente com o óleo de *E. radiata*. Os valores de CIM e concentração bactericida mínima (CBM) evidenciaram que *L. officinalis* apresentou efeito bacteriostático e os demais óleos testados apresentaram atividade bactericida. Todos os óleos essenciais testados nesse estudo inibiram a adesão de *S. mutans*.

O óleo essencial obtido a partir de *Artemisia feddei* foi avaliado quanto à sua composição química e atividade antibacteriana contra quinze gêneros diferentes de bactérias orais. Os resultados mostraram considerável efeito inibitório contra todas as bactérias testadas (CIM de 0,025-0,05 mg/mL; CBM de 0,025-0,1 mg/mL),

enquanto seus compostos principais exerceram vários graus de inibição de crescimento (Cha et al., 2007).

Duarte et al. (2005) investigaram óleos essenciais e extratos etanólicos obtidos de 35 plantas medicinais comumente usadas no Brasil para atividade anti-*C. albicans*. Os óleos essenciais de 13 plantas mostraram atividade, incluindo *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *Cyperus articulatus*, *C. rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, *Mentha* sp., *Mikania glomerata*, *Stachys byzantina* e *Solidago chilensis*, com concentrações mínimas inibitórias de 0,25 a 2,0 mg/mL.

Alguns óleos essenciais selecionados para o presente estudo já foram pesquisados previamente em relação à atividade antimicrobiana contra patógenos orais, como é o caso do óleo de *C. articulatus* (Zoghbi et al., 2006; Oladusu et al., 2011) *Coriandrum sativum* (Furletti et al., 2011; Freires et al., 2014), *C. martinii* (Duarte et al., 2005) e *Lippia sidoides* (Botelho et al., 2007).

Furletti et al. (2011) avaliaram a eficácia de extratos e óleos essenciais de *Allium tuberosum*, *C. sativum*, *C. martini*, *C. winterianus* e *Santolina chamaecyparissus*, contra *Candida* spp. isolados a partir da cavidade oral de pacientes com doença periodontal. O óleo mais ativo foi fracionado e avaliado quanto à inibição da formação do biofilme pela *C. albicans*. As melhores atividades contra *Candida* spp. planctônicas foram observadas para o óleo essencial *C. sativum* bruto e frações. O óleo essencial bruto também afetou a formação de biofilme em *C. albicans*, causando uma diminuição do crescimento do biofilme.

Com o objetivo de avaliar a composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidoides*, Botelho et al. (2007) caracterizaram os principais constituintes deste óleo, o timol (56,7%) e o carvacrol (16,7%). A atividade antimicrobiana dos principais componentes do óleo foi testada contra espécies do gênero *Streptococcus* e contra a levedura *C. albicans*, por meio dos testes de diluição em caldo e difusão em disco. O óleo essencial e seus principais componentes exibiram uma potente atividade antimicrobiana contra os organismos testados com concentrações inibitórias mínimas entre 0,625 e 10,0 mg/mL.

Os óleos essenciais de *M. piperita*, *M. spicata*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *O. applii*, *A. triphylla*, *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum* foram avaliados



quanto a atividade antibacteriana e anti-*Candida albicans* em estudo de Sartoratto et al. (2004). Os óleos essenciais foram mais eficazes contra *E. faecium* e *Salmonella cholerasuis*. *A. triphylla* e *O. basilicum* apresentaram inibição moderada contra *Staphylococcus aureus*, enquanto apenas *A. tryphila* e *M. piperita* foram capazes de controlar a *C. albicans*. Entre as plantas aromáticas estudadas, os principais constituintes encontrados foram os monoterpenos linalol, eugenol e timol.

Conforme relatado, muitos estudos comprovam a suscetibilidade de uma gama de bactérias orais aos óleos essenciais, o que sugere que os mesmos podem ser utilizados em produtos de saúde oral e na manutenção da higiene bucal.

Alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos endodônticos, principalmente contra *E. faecalis*. Como exemplo, Cavalcanti et al. (2011) avaliaram o efeito inibitório dos óleos essenciais de *M. alternifolia* (melaleuca), *C. winterianus* (citronela), *T. vulgaris* (tomilho), *O. basilicum* (manjerição), *C. martinii* (palmarosa) e *Cinnamomum cassia* (canela-da-china) sobre *C. albicans* e *E. faecalis*. Os resultados de halos de inibição do crescimento para *E. faecalis* variaram entre 8,00 e 26,00 mm, enquanto que a variação para *C. albicans* foi entre 26,67 e >35,00 mm. Os óleos essenciais de *T. vulgaris*, *C. martinii* e *C. cassia* apresentaram CIM na concentração 0,56 mg/mL frente às cepas testadas. Menor atividade foi demonstrada por *O. basilicum*, que apresentou CIM nas concentrações de 72,00 e 1,12 mg/mL contra *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente.

O objetivo do estudo *in vitro* realizado por Murray et al. (2008) foi comparar a eficácia do suco de *Morinda citrifolia* com hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina para remoção da *smear layer* das paredes do canal radicular de dentes instrumentados endodonticamente. Sessenta pré-molares humanos extraídos, com um único canal, foram inoculados com *E. faecalis* à 37 °C sob atmosfera de CO<sub>2</sub> durante 30 dias. As análises foram feitas por MEV - microscopia eletrônica de varredura. A remoção mais eficaz da *smear layer* ocorreu com o suco de *M. citrifolia* e hipoclorito de sódio, ambos com irrigação final de EDTA a 17%.

Outro estudo avaliou a ação de óleos essenciais e extratos de plantas na remoção da *smear layer* do canal radicular (Sadr et al., 2006). O extrato de camomila foi mais eficaz na remoção da *smear layer* que o hipoclorito de sódio 2,5% isolado, mas inferior que o hipoclorito combinado com EDTA.

Dentre as plantas medicinais escolhidas para o presente estudo, o *Cymbopogon* é um gênero botânico pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae. Este gênero é composto por aproximadamente 155 espécies encontradas na Europa, África, Ásia, Austrália, América do Norte e América do Sul. Uma planta da família dos capins é a palmarosa (*C. martinii*), que por possuir geraniol em seu óleo tem um aroma que lembra o do gerânio ou da rosa. A palmarosa é muito utilizada em tratamentos de pele, auxiliando a tratar a acne e inflamações, agindo como rejuvenescedora e citofilática e, por isso, é muito empregada na indústria cosmética (Furletti et al., 2011).

A *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae), comumente conhecido no Brasil como "falsa mirra" ou incenso ou limonete, é uma planta herbácea e aromática que se originou na África do Sul, sendo introduzida como planta ornamental exótica no Brasil (Gazim et al., 2010). Na medicina popular esta espécie é usada para tratar dores de dente e abscessos odontológicos, malária e doenças induzidas por vermes, bactérias, ou fungos, entre outros (Melo et al., 2015), além de possuir folhas repelentes, inseticidas e ter ação antinociceptiva (Gazim et al., 2010). Koo et al. (2002) atribuíram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. riparia* contra os patógenos orais *S. sobrinus* e *S. mutans* pode estar relacionada com a presença de sesquiterpeno (E, E) -farnesol, um dos principais constituintes do óleo essencial em seu estudo. Recentemente, a atividade antimicrobiana deste óleo contra *C. albicans*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* e *Salmonella enterica* foi relatada por Gazim et al. (2010). No entanto, apesar do seu uso na medicina popular para tratar dores e abscessos dentários, os efeitos deste óleo essencial contra agentes patogênicos orais têm sido pouco investigados (Melo et al., 2015).

## **2.9 Avaliação da eficiência antimicrobiana dos tratamentos endodônticos**

A eficiência antimicrobiana de diferentes tratamentos endodônticos *ex-vivo* tem sido avaliada em diferentes níveis do canal radicular por procedimentos como cortes histológicos, observação ao microscópio eletrônico de varredura e análises microbiológicas. A capacidade das bactérias em penetrar na dentina pode ser

determinada através de análises microbiológicas da amostra histológica, que visam determinar o número de túbulos dentinários infectados ou a presença de bactérias nas paredes do canal radicular, por determinação de unidades formadoras de colônias - UFC (Zapata et al., 2008).

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) permite obter uma série de secções ópticas tão finas quanto 0,3  $\mu\text{m}$  de amostras biológicas intactas. A análise em MCVL é usada geralmente com técnicas de coloração vitais para determinar o perfil de viabilidade, arquitetura e a distribuição espacial em biofilmes microbianos (Andrade et al., 2015). Além disso, a capacidade de analisar amostras em espessura de dentina com o mínimo de preparo fornece um exame em condições ambientais muito próximas da situação *in vivo*. A MCVL dá informação sobre a gravidade da infecção dentinária e a vitalidade de bactérias nos túbulos dentinários.

Apesar dos grandes avanços na tecnologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar espécies de difícil cultivo e micro-organismos incultiváveis (Gomes et al., 2008), os métodos baseados em PCR não permitem distinguir entre o DNA a partir de células viáveis ou mortas (Cook et al., 2007). Este fato é importante durante a caracterização da microflora que sobrevive ao tratamento endodôntico. Assim, a detecção *in situ* do DNA e RNA bacterianos e a determinação da viabilidade utilizando MCVL podem ser promissores para elucidar a importância das bactérias residuais em estado incultivável ou detectável apenas por PCR, especialmente após a utilização de hipoclorito de sódio que destrói eficientemente o DNA bacteriano (Zapata et al., 2008).

A este respeito, Guerreiro-Tanomaru et al. (2013) compararam a formação de biofilme de *E. faecalis* em diferentes substratos. Placas de cultura de células com meio de cultura e inóculo de *E. faecalis* foram utilizados para o desenvolvimento de biofilme sobre dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino. Os substratos foram incubados a 37 °C durante 14 ou 21 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 48 horas. Após os períodos de indução de crescimento, as amostras foram coradas e as imagens analisadas por MCVL. A formação de biofilme foi observada em todos os grupos, sendo que o *E. faecalis* foi capaz de formar biofilmes em todos os substratos durante os dois períodos de crescimento, apresentando as maiores taxas de formação em hidroxiapatita. De acordo com os parâmetros avaliados, o tipo de substrato influenciou as características do biofilme. Assim, o

desenvolvimento do biofilme *in vitro* permite a avaliação da ação antimicrobiana de cimentos endodônticos, soluções irrigantes e medicações intracanais contra colônias de micro-organismos.

Del Carpio-Perochena et al. (2011) concluíram em seu estudo que as soluções de NaOCl foram mais eficazes do que a clorexidina 2% para eliminação de biofilmes orais. Trinta minutos de NaOCl foram necessários para alcançar os valores mais elevados de dissolução do biofilme e para aumentar a limpeza da dentina, principalmente em concentrações de 1% e 2,5%. Sob condições clínicas, um tempo de contato inferior no terço apical pode ser insuficiente para permitir uma desintegração total do biofilme intrarradicular. Os resultados sugerem que a clorexidina 2% pode ter um efeito químico limitado durante os procedimentos de instrumentação, especialmente em áreas intocadas como istmos de anatomias complexas. NaOCl 1% apresentou o mesmo efeito sobre biofilmes que a concentração de 5,25% após 30 minutos de contato.

Delgado et al. (2013) apresentaram uma metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio e clorexidina na dentina intertubular. Para isso, dentes unirradiculares humanos foram contaminados com *E. faecalis* e tratados com as substâncias a serem testadas. As amostras foram obtidas a uma profundidade de 0 a 100 µm e de 100 a 200 µm da dentina, a partir dos preparos dos canais radiculares, e analisadas por meio da contagem de UFC e microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram a redução significativa do número de UFC e a redução da porcentagem de *E. faecalis* viável após tratamento com hidróxido de cálcio ou clorexidina, quando comparado ao grupo controle.

Berber et al. (2006) desenvolveram um estudo para avaliar a eficácia da irrigação com hipoclorito de sódio a 0,5%, 2,5% e 5,25%, e técnicas manual e rotatória de preparo dos canais radiculares contra *E. faecalis* no canal radicular e túbulos dentinários. Para isso, utilizaram 180 pré-molares humanos extraídos, que foram infectados durante 21 dias com *E. faecalis*. Os espécimes foram divididos em 12 grupos, conforme a substância irrigadora e técnica de instrumentação. As amostras dos canais radiculares foram coletadas antes e depois do preparo químico-mecânico, então plaqueadas em ágar BHI e as UFC foram determinadas. Em seguida, os dentes foram seccionados em 3 terços e raspas de dentina foram removidas das camadas internas dos canais com brocas cônicas. As amostras obtidas por cada broca foram

transferidas a tubos contendo caldo BHI, sendo incubadas a 37 °C e plaqueadas em ágar BHI para a contagem das UFC. De acordo com os resultados obtidos, nas profundidades e terços dos canais radiculares submetidos a todas as técnicas usadas, o NaOCl a 5% mostrou ser a solução irrigante mais efetiva. Assim, concluiu-se que o hipoclorito de sódio, especialmente em altas concentrações é eficaz na desinfecção de túbulos dentinários, independente da técnica de instrumentação utilizada.

Nos últimos anos, vários avanços foram feitos para avaliação das bactérias e biofilmes bacterianos presentes em dentina por meio de MCVL. Zapata et al. (2008) demonstraram que a discriminação entre bactérias vivas e mortas em túbulos dentinários infectados poderia ser realizada por MCVL após coloração com os corantes de viabilidade celular, como por exemplo diacetato de fluoresceína e o iodeto de propídio.

Biofilmes jovens e maduros de *E. faecalis* em dentina foram sujeitos a água esterilizada, CHX 2%, NaOCl 2% e NaOCl 6% por 3, 10 e 30 minutos. Após os tratamentos, a proporção de bactérias mortas pelos desinfetantes foi analisada por MCVL, usando o corante *Live/Dead®* para a visualização da viabilidade bacteriana (Du et al., 2014). A proporção de bactérias mortas foi menor após 3 minutos, em relação à exposição aos agentes desinfetantes por 10 e 30 minutos. NaOCl 6% foi a solução antibacteriana mais eficaz tanto contra biofilmes de 1 dia quanto de 3 semanas. Significativamente, maior número de células foram mortas em biofilmes jovens do que nos biofilmes maduros em todos os grupos. A morte de bactérias em dentina infectada, por soluções desinfetantes é tempo-dependente. No entanto, pouca eliminação adicional foi obtida após 10 minutos de exposição (Du et al., 2014). Assim, é importante balancear a eficácia antimicrobiana do hipoclorito com a minimização dos efeitos sobre dentina ou utilizar substâncias que não possuem impacto negativo nas propriedades dentinárias.

Em estudos anteriores, Ozdemir et al. (2010) e Shen et al. (2011) determinaram que as bactérias em biofilmes jovens em dentina foram mais suscetíveis aos irrigantes do que as células em biofilmes maduros. Em biofilmes jovens, um maior número de bactérias encontra-se em fase de crescimento exponencial e o desenvolvimento da matriz do biofilme ainda não está completa. Assim, a barreira física de matriz extracelular polimérica, o estado VBNC em biofilmes maduros e as células persistentes podem contribuir para a alta resistência das bactérias em

biofilmes maduros. Neste sentido, os resultados desses estudos indicam que biofilmes maduros e biofilmes com oferta limitada de nutrientes são mais resistentes à CHX do que biofilmes jovens, sob condições nutricionais normais.

Quando avaliado o efeito antimicrobiano de soluções endodônticas utilizadas como irrigação final, o efeito de CHX 2% sobre a viabilidade de biofilme foi limitado em comparação com NaOCl (Clegg et al., 2006, Chávez de Paz et al., 2010). Além disso, Ordinola-Zapata et al. (2012) concluíram que o hipoclorito de sódio 1% foi o único irrigante que mostrou um efeito significativo tanto na arquitetura quanto na viabilidade do biofilme bacteriano.

Um modelo não invasivo de contaminação dos túbulos dentinários foi estabelecido por Ma et al. (2011), para testar a eficácia da desinfecção em dentina, e posterior análise por MCVL. Os autores sugeriram um modelo tridimensional para avaliação quantitativa *in vitro* de bactérias viáveis em dentina por MCVL, após a infecção e desinfecção dos túbulos dentinários. Para isso, amostras semicilíndricas de dentina bovina foram infectadas com *E. faecalis* por centrifugação com a suspensão bacteriana, visando a penetração do micro-organismo no interior dos túbulos. Após 24 h, as amostras foram submetidas a 1 e 3 min de exposição a água estéril, NaOCl 1%, 2% e 6%, CHX 2% e Qmix (EDTA, CHX e cetrimida), e foram avaliadas por MCVL. A quantidade de células mortas na dentina foi maior com o aumento da concentração do NaOCl e o tempo de exposição. O Qmix foi igualmente eficaz ao NaOCl 6% na eliminação do *E. faecalis* dos túbulos dentinários. Assim, a centrifugação ajudou a criar uma infecção maciça, uniformemente distribuída em profundidade nos túbulos dentinários, sendo um método não invasivo para avaliação da atividade antibacteriana de soluções irrigadoras nos túbulos dentinários.

Este modelo de infecção, onde as bactérias são forçadas para o interior da dentina por centrifugação permite a produção de um grande número de amostras de dentina infectada, com uma quantidade comparável de bactérias nos túbulos de diferentes espécimes. Já a coloração de viabilidade baseia-se no princípio de que o corante vermelho penetra apenas nas células em que a membrana celular está danificada, enquanto o corante verde pode penetrar em todas as células. Por conseguinte, é possível que em alguns casos a fluorescência vermelha pode dar um resultado falso-positivo quando interpretada como uma célula morta, se a célula for ainda viva embora danificada. Foi relatado que o EDTA pode afetar a parede celular

bacteriana permitindo a entrada do corante vermelho em células de *E. faecalis*, mesmo que estas células não tenham sido mortas pelo EDTA (Wang et al., 2013). Apesar da sua deficiência, a coloração de viabilidade celular tornou-se o método de escolha na mensuração da morte bacteriana em biofilmes. A metodologia permite a medição da proporção relativa de bactérias mortas em cada espécime, o que não tem sido possível por meio da utilização de métodos de cultura (Zapata et al., 2008; Du et al., 2014).

### 3 PROPOSIÇÃO

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida (CBM) ou fungicida mínima (CFM).
- Avaliar *in vitro* a inibição da formação de biofilmes de *E. faecalis* e *C. albicans* na presença dos óleos essenciais.
- Determinar a composição química dos óleos essenciais de melhor atividade frente aos endopatógenos.
- Determinar a citotoxicidade dos óleos essenciais mais ativos sobre células normais HaCat – queratinócito humano.
- Definir as propriedades físico-químicas de tensão superficial e densidade das soluções irrigadoras estudadas.
- Quantificar por meio de cultura microbiológica e análise por microscopia confocal de varredura a Laser (MCVL), a proporção de micro-organismos eliminados pelo tratamento com óleos essenciais, tanto no canal radicular quanto nos túbulos dentinários em testes *ex vivo*, comparando tais parâmetros às soluções de uso convencional em endodontia, o hipoclorito de sódio e a clorexidina gel.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Plantas medicinais**

Foram definidas para estudo 24 plantas medicinais e/ou aromáticas pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas CPQBA/UNICAMP, conforme Tabela 1.

A escolha das plantas foi feita tendo como critério a indicação de uso popular (etnobotânico) e/ou terapêutico, e os resultados de trabalhos anteriores obtidos na Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP. As amostras foram coletadas no período compreendido entre dezembro de 2011 a julho de 2012, no período da manhã, após o ponto de orvalho, garantindo a reprodutibilidade da pesquisa. Em seguida, foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, onde foram pesadas, sendo uma porção retirada para secagem e determinação do teor de umidade, para posteriores cálculos de rendimento em óleo essencial.

Vouchers das espécies foram depositados no Herbário do Instituto de Biologia da Unicamp - UEC e identificados pelo Dr. Washington Marcondes Ferreira Neto (curador), ou no herbário do CPQBA.

A utilização das espécies nativas listadas na Tabela 1 foi realizada mediante autorização de acesso ao patrimônio genético – APG, do CNPq, sob número 0107962013-4.

### **4.2 Determinação do rendimento**

Foi calculado o rendimento em óleo essencial em função da massa (g) de óleo extraído e a massa (g) de planta seca.

### 4.3 Obtenção dos óleos essenciais para triagem da atividade antimicrobiana

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se 100 g da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, adicionando-se 700 mL de água destilada e procedendo-se a destilação por 2 h. Em seguida, o óleo essencial obtido foi recolhido em frasco apropriado, lacrado e armazenado a baixa temperatura (-25 °C).

Tabela 1. Plantas medicinais e aromáticas da CPMA selecionadas para o presente estudo.

Espécie medicinal	Família Botânica	Nome Popular	No. CPMA	Origem
<i>Artemisia annua</i> L.	Asteraceae	Artemisia	1855	E
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	Asteraceae	Vassourinha	787	N
<i>Bixa orellana</i> L	Bixaceae	Urucum	252	E
<i>Calamintha nepeta</i> L. Kuntze	Lamiaceae	Salvia europeia	672	E
<i>Cordia guazumaefolia</i> (Desv.) Roem. & Schult	Boraginaceae	Cordia (chá de bugre)	1767	N
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	Coentro	C	E
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) Will. Watson	Poaceae	Palmarosa	354	E
<i>Cyperus articulatus</i> L. (Benício)	Cyperaceae	Priprica	222	N
<i>Eugenia caryophyllata</i> (Spreng.) Bullock & S. G.	Myrtaceae	Cravo	C	E
<i>Elyonurus muticus</i> (Spreng.) Kuntze	Poaceae	Capim-carona	1701	N
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Verbenaceae	Estrepa-cavalo	2082	N
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Lamiaceae	Alfavacão	446	E
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano	515	E
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf.	Rutaceae	Jaborandi do norte	320	N
<i>Piper caldense</i> C DC.	Piperaceae	Paguarandy	2248	N
<i>Piper cernuum</i> Vell	Piperaceae	Folha grande	1881	N
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	Asteraceae	Santolina	2024	E
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae	Pimenta rosa	1707	N
<i>Tagetes minuta</i> L.	Asteraceae	Cravo de defunto	2436	N
<i>Tetradenia riparia</i> (Hochst) codd	Lamiaceae	Limonete	450	E
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Tomilho	2171	E
<i>Varronia curassavia</i> (Jacq.) Roem. & Schult	Boraginaceae	Erva baleeira	115	N
<i>Vitex agnus castus</i> L.	Lamiaceae	Vitex	1974	E
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Gengibre	533	E

C= comercial; E= exótica; N= nativa

#### 4.4 Micro-organismos, meios de cultura e manutenção

Foram utilizadas cepas de referência padrão e cepas provenientes de coletas clínicas de *E. faecalis* e *C. albicans*. As cepas de isolado clínico (IC) foram cedidas pelo laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP. Os micro-organismos foram coletados do canal radicular em pacientes portadores de periodontite apical persistente. A identificação dos micro-organismos foi realizada por cultura em meio seletivo e análise molecular. O método utilizado para a coleta de amostras foi descrito previamente por Gomes et al. (2004, 2006) e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas FOP-UNICAMP sob protocolo número 018/2014 (Anexo 2).

A bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa *E. faecalis* (cepa padrão ATCC - American Type Culture Collection- 29212 e IC) foi mantida em caldo BHI - Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) e repicada no respectivo ágar antes dos ensaios de atividade antimicrobiana, seguido de incubação a 37 °C durante 24 h.

A levedura anaeróbia facultativa *C. albicans* (cepa padrão CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures - 562 e IC) foi mantida em caldo SDB (Sabouraud Dextrose Broth) e repicada em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) antes dos ensaios de atividade antimicrobiana, seguido de incubação a 37 °C durante 48 h.

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizados os meios BHI para *E. faecalis* e RPMI-1640 para *C. albicans*.

#### 4.5 Triagem *in vitro* da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método da microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2005)

##### 4.5.1 Preparo dos óleos essenciais

Para uso nos testes de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, os óleos essenciais foram solubilizados em meio de cultura contendo

até 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução aquosa de Tween 80 a 0,1% em quantidade suficiente para diluição, até a concentração de 20 mg/mL.

#### 4.5.2 Preparo de inóculo padronizado

O preparo do inóculo de *E. faecalis* para os testes de susceptibilidade foi realizado segundo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (CLSI, 2005). Amostra da cultura de *E. faecalis* cultivada em ágar BHI por 24 h foi transferida para tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina 0,85% estéril. A solução da bactéria foi homogeneizada em *vortex* e uma alíquota de 2 mL foi tomada para leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 625 nm, e ajustadas com solução salina para densidade ótica (DO) de 0,08 a 0,10, correspondente à concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Aos 2 mL remanescentes das suspensões de bactérias foram adicionadas as mesmas quantidades de solução salina utilizada no ajuste em espectrofotômetro. A partir das soluções padronizadas, procedeu-se a diluição seriada de forma a se obter, ao final da mesma, a concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL e, destas últimas soluções, 6 mL foram transferidos para tubos contendo 3 mL de meio de cultura (caldo BHI), estabelecendo-se uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL ou  $1,0 \times 10^5$  em 100  $\mu$ L.

A levedura *C. albicans* foi cultivada em tubo de ensaio contendo o meio SDA a 35 °C por 48 h. Após o crescimento das células, alíquotas da cultura foram retiradas com alça de platina e transferidas para tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina 0,85% estéril. A solução de levedura foi homogeneizada em *vortex* e uma alíquota (2 mL) lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 530 nm, sendo ajustada com solução salina 0,85% para uma DO de 0,09 a 0,11, correspondente a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL. À suspensão remanescente (2 mL) foi adicionada a mesma quantidade de solução salina utilizada na leitura em espectrofotômetro. Em seguida, a solução padronizada foi diluída para uma concentração de  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL. Por fim, 1 mL desta solução foi transferida para tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo RPMI-1640, correspondendo à concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL ou  $2,5 \times 10^2$  UFC em 100  $\mu$ L (CLSI, 2002).

#### 4.5.3 Teste da Microdiluição

Em uma microplaca esterilizada de 96 compartimentos foram depositados 100 µL de caldo BHI ou caldo RPMI-1640 em cada poço, dependendo do micro-organismo. Na primeira linha da placa (A) foram depositados 50 µL do óleo diluído (controle de esterilidade das amostras). Na segunda linha (B) foram depositados 100 µL de cada óleo, sendo o conteúdo dos orifícios homogeneizados com o meio e transferidos para os orifícios da linha seguinte, repetindo-se o procedimento até a linha H, de modo a obter concentrações entre 0,007 e 1 mg/mL, sendo os 100 µL finais desprezados. Posteriormente, das linhas B a H foram adicionados 100 µL do inóculo padronizado. Foram também realizados ensaios de controle do crescimento dos micro-organismos e controle de esterilidade dos meios de cultura.

Cada amostra foi analisada em duplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 h (*E. faecalis*) ou 48 h (*C. albicans*).

#### 4.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para *E. faecalis*, após o período de incubação foram depositados em todos os compartimentos da placa, 30 µL de solução de resazurina 0,01% (Galvão et al., 2012) e as placas foram reincubadas por um período de 2 h. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de impedir a mudança da cor azul do indicador para rosa, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória. A resazurina é um indicador de oxirredução utilizado para avaliar a viabilidade bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana de determinadas substâncias (Palomino et al., 2002). Para *C. albicans*, após o período de incubação foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

#### 4.5.5 Determinação da Concentração Bactericida (CBM) ou Fungicida Mínima (CFM)

Os óleos essenciais foram avaliados quanto à concentração bactericida (CBM) ou fungicida mínima (CFM), através do plaqueamento de 10 µL do material contido no poço de CIM e dos três poços subsequentes de maior concentração. Os meios de cultura utilizados foram ágar BHI para *E. faecalis* e SBA para *C. albicans*. As placas foram incubadas a 35 °C durante 3 dias (*E. faecalis*) e até 5 dias (*C. albicans*), e avaliadas quanto ao crescimento de colônias dos micro-organismos nas diferentes concentrações dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais mais ativos foram combinados em blendas na proporção 1:1. A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de blendas foi também realizada conforme os itens 4.5.1. a 4.5.5.

#### 4.6 Formação de biofilme pelos micro-organismos orais

Os biofilmes foram produzidos em placas esterilizadas de polietileno de 96 poços de fundo redondo, não tratadas. Para avaliar a inibição dos óleos essenciais sobre a formação do biofilme dos micro-organismos, foram realizados testes de aplicação dos óleos essenciais em concentrações correspondentes à CIM encontrada para a célula planctônica e duas vezes esta (2CIM). Para *E. faecalis* foi utilizado o caldo BHI e para *C. albicans* o SDB como meio de cultura.

Para os testes em biofilme, os inóculos padronizados foram preparados de modo a conter  $1,0 \times 10^7$  células/mL para o *E. faecalis* e  $5 \times 10^6$  células/mL para *C. albicans*. Foram acrescentados em cada poço da placa 100 µL do meio de cultura suplementado com 2% de sacarose (Furletti et al., 2011). Na primeira linha foram adicionados 100 µL da amostra dos óleos essenciais na concentração de 20 mg/mL, e em seguida foi feita a diluição seriada. Foram então adicionados 100 µL no inóculo padronizado e realizada incubação à 37 °C por 48 h, sob aerobiose. Foi realizado um controle positivo com hipoclorito de sódio a 2,5%. Todas os ensaios foram feitos em triplicata.

O biofilme formado foi quantificado através de coloração com solução de cristal violeta e leitura espectrofotométrica em leitor de microplaca de Elisa (ASYS), de acordo com metodologia proposta por Djordjevic et al. (2002).

Previamente, o biofilme desenvolvido em cada poço foi lavado duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS seguido de secagem ao ar ambiente por 45 min. A cada poço foi acrescentado 110  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cristal violeta a 0,4% por 45 min. Após realização deste procedimento, cada poço foi lavado 4 vezes com 350  $\mu\text{L}$  de água destilada e imediatamente descorados com 250  $\mu\text{L}$  de etanol a 95%. Após 45 min, 100  $\mu\text{L}$  da solução descorada foi transferida para um poço de uma nova placa e a quantidade do cristal violeta mensurada a 595 nm no leitor de Elisa. Os valores de absorbância foram subtraídos dos valores de absorbância do controle da amostra (branco) de modo a avaliar a quantidade de biofilme formado na presença do óleo essencial.

#### **4.7 Identificação dos constituintes químicos voláteis dos óleos essenciais mais ativos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas - CG-EM**

Foi realizada a caracterização química dos óleos essenciais com melhor resposta antimicrobiana aos testes de microdiluição e biofilme. A identificação dos constituintes voláteis foi conduzida em cromatógrafo a gás (Agilent Technologies 6890N), equipado com detector seletivo de massas Agilent Technologies 5975 e coluna capilar HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  diâmetro). Foi utilizado injetor *split/splitless* (injetor a 220  $^{\circ}\text{C}$ , coluna a 60  $^{\circ}\text{C}$ , rampa de aquecimento de 3  $^{\circ}\text{C} \times \text{min}^{-1}$  e temperatura final de 240  $^{\circ}\text{C}$ ), e detector FID a 250  $^{\circ}\text{C}$ . Hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL  $\times \text{min}^{-1}$ . O sistema de ionização de elétrons foi a 70 eV. A amostra do óleo essencial foi solubilizada em acetato de etila para as análises. O Índice de Retenção (IR) foi determinado pela injeção de padrões de hidrocarbonetos. Os constituintes dos óleos foram identificados por comparação com dados de IR da literatura (Adams, 2007) e perfis da biblioteca Nist 05.

Os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Adilson Sartoratto, da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP.

#### 4.8 Análise da tensiometria e densidade

Foram realizadas as análises de tensão superficial (em mN/m) e densidade (g/mL) das soluções irrigadoras utilizadas nos ensaios em dentes extraídos por meio de tensiômetro (K20, Krüss, Hamburg, Alemanha), na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/Unicamp. As leituras foram feitas em triplicata pelo método Du Nouy ring.

O soro fisiológico utilizado para a irrigação com a clorexidina e o hipoclorito de sódio foram utilizados como controles positivos. A solução aquosa de Tween 80 0,1% utilizada para a solubilização dos óleos essenciais foi utilizada como controle negativo. Os dados de tensão superficial foram submetidos à análise estatística ( $p < 0,05$ ).

#### 4.9 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* para células HaCat

Os óleos essenciais mais ativos em relação à atividade antimicrobiana foram avaliados quanto a sua toxicidade sobre células normais HaCat – queratinócito humano, doada pelo professor doutor Ricardo Della Coletta, do Departamento de Diagnóstico Oral, área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp.

Foi utilizado o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (Monks et al, 1991). Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc®), da suspensão celular, na densidade de inoculação de  $5,0 \times 10^4$  cel/mL em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 5% (SFB), acrescido de penicilina: estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1 mL/L RPMI). Após 24 h de incubação a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> foram adicionados 100 µL/compartimento da amostra a ser testada, em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). Para o preparo das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída



sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interfere no crescimento celular.

Ao final de 48 h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e as placas incubadas por 1 h a 4 °C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 min, a temperatura ambiente; em seguida, foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, o crescimento celular, expresso em porcentagem, foi calculado a partir das concentrações efetivas por progressão linear para TGI- *Total Growth Inhibition* (concentração necessária para que ocorra 0% do crescimento celular). Com base nos valores TGI, os óleos essenciais selecionados foram classificados como inativo (TGI > 50 µg/mL), fraca atividade (15 µg/mL < TGI < 50 µg/mL) atividade moderada (6,25 µg/mL < TGI < 15 µg/mL) e forte atividade (TGI < 6,25 µg/mL).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, em colaboração com a Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.

#### **4.10 Avaliação da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras *ex vivo***

A seleção do óleo essencial ou blenda a ser utilizada como solução irrigadora durante os ensaios em dentes humanos extraídos seguiu os seguintes critérios: melhor atividade frente aos micro-organismos na fase planctônica (menor

valor de CIM e CBM/CFM), melhor atividade na inibição da formação de biofilme tanto em cepas padrão quanto isolados clínicos e apresentar baixa citotoxicidade *in vitro*.

Esta etapa da pesquisa foi submetida à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/Unicamp, sendo aprovada pelo protocolo CEP-FOP/UNICAMP 027/2014 (Anexo 1).

Foram utilizados 40 pré-molares inferiores humanos extraídos, com dimensões semelhantes, ápices completos, provenientes do Banco de Dentes Humanos da Universidade Comunitária na Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ/SC). Foram realizadas radiografias nos sentidos vestibulo-lingual e méso-distal para averiguação da existência de canal único e reto, ausência de calcificações e reabsorções. Os dentes selecionados foram seccionados abaixo da junção cimento-esmalte utilizando disco de carborundum acoplado a mandril em micromotor, de modo a obter um segmento radicular de 15 mm de comprimento, aferido por meio de paquímetro digital.

Os segmentos radiculares foram submetidos à instrumentação prévia para padronização do diâmetro dos canais radiculares e forames apicais. Assim, foi realizado o preparo da entrada do canal radicular com brocas Gates-Glidden nº 3 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland) e exploração do canal radicular em toda sua extensão com lima K #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland) até o forame apical. As raízes que não apresentavam patência apical ou cujo forame era menor que a lima K #10, ou maior que a lima K #20 foram descartadas.

Foi realizada a instrumentação inicial desde o diâmetro anatômico inicial, em sequência, até a lima K #20, em toda a extensão do canal radicular. Durante a troca de instrumentos, o canal radicular foi irrigado com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%. Ao final, foram irrigados com 5 mL de solução de tiosulfato de sódio 5%, a fim de neutralizar o hipoclorito de sódio.

A *smear layer* formada durante a instrumentação inicial foi removida lavando-se os dentes com EDTA 17% por 10 min, e em seguida com NaOCl 5,25% por mais 10 min, sob agitação constante em cuba ultrassônica (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo, Brasil). Então, os espécimes foram submetidos a uma nova lavagem com solução de fosfato tamponado por 10 min, seguida de água destilada

por 1 h, para a remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl (Ferraz et al., 2001).

Os substratos radiculares foram inseridos em um tubo de ensaio contendo água destilada e autoclavados a 121 °C durante 20 min (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013). Os procedimentos microbiológicos e a manipulação dos corpos de prova foram conduzidos sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, com prévia desinfecção com álcool 70% e incidência de luz ultravioleta por 30 min. Todos os materiais e instrumentos utilizados foram previamente esterilizados.

Os espécimes dentários estéreis foram inseridos individualmente em microtubos de centrífuga de polipropileno com fundo cônico (*Eppendorf's* - Elkay Products Inc.-Shrewsbury, USA), com capacidade para 1,5 mL para a inoculação dos micro-organismos.

Cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212) e *C. albicans* (CBS 562) em culturas mistas em caldo BHI foram utilizadas para a inoculação dos canais radiculares. Após a confirmação da pureza da amostra por coloração de Gram e morfologia das colônias, as células foram cultivadas em 4 mL de meio de cultura em caldo BHI estéril por 24 h (*E. faecalis*) ou 48 h (*C. albicans*) a 37 °C. As densidades celulares para *E. faecalis* e *C. albicans* foram ajustadas em espectrofotômetro para  $10^6$  células/mL, utilizando-se comprimento de onda de 760 nm e 530 nm, e densidade óptica de 0,298 e 0,284, respectivamente.

O protocolo de contaminação seguido foi baseado no estudo de Ma et al. (2011) com algumas modificações, que preconiza ciclos de centrifugação para a colonização dos túbulos dentinários.

Cada microtubo contendo o espécime radicular foi preenchido com 500 µL da suspensão de *E. faecalis* e 500 µL de *C. albicans* em caldo BHI. Os tubos foram centrifugados a 1400g, 2000g, 3600g e 5600g. A cada ciclo de centrifugação, 200 µL do meio de cultura antigo foi descartado e acrescentado 200 µL do meio de cultura BHI estéril. Os tubos foram incubados a 37 °C e a etapa de centrifugação repetida em dias alternados, até completar 15 dias de inoculação.

#### 4.10.1 Avaliação da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras no canal radicular

Ao término do procedimento de inoculação, a contaminação do canal radicular foi confirmada por meio de coleta com cones de papel absorvente estéril (TANARI, Tanarian Industrial Ltda, Macapuru- AM) para plaqueamento para cultura microbiológica. Foram inseridos 4 cones nos canais radiculares no comprimento do dente, durante 1 min. Para a confirmação da contaminação dos túbulos dentinários, duas amostras foram utilizadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e duas amostras para microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Os cones utilizados nas coletas das amostras de micro-organismos foram transferidos para microtubos tipo *Eppendorf* estéreis contendo meio de transporte VMGA III.

As amostras do canal radicular contidas nos tubos foram agitadas por 60 seg no interior da câmara de fluxo laminar. A partir disso foram realizadas diluições decimais seriadas em salina e alíquotas de 100 µL foram semeadas em triplicata em placas contendo ágar M-Enterococcus ou SDA acrescido de 0,1% de cloranfenicol, para verificação do crescimento seletivo de *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente, por meio da contagem de UFC/mL. As placas de ágar M-Enterococcus foram incubadas em 5% CO<sub>2</sub>, à 37 °C por 2 dias. As placas de SDA foram incubadas por 4 dias à temperatura ambiente e depois incubadas em 10% CO<sub>2</sub>, à 37 °C por 2 dias.

As amostras radiculares foram aleatoriamente distribuídas em 6 grupos (n=6), de acordo com a solução irrigadora utilizada e fixadas em suporte metálico para instrumentação. Três destes grupos foram compostos pelos óleos essenciais ou blendas que apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra os endopatógenos nos ensaios de determinação de CIM e CBM/CFM (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3). Os óleos essenciais/blendas foram previamente solubilizados em solução aquosa de Tween 80 a 0,1% para possibilitar a irrigação dos canais radiculares. O grupo 4 foi composto pelo hipoclorito de sódio a 5,25% (controle positivo); o Grupo 5 foi composto por clorexidina gel 2% + soro fisiológico (controle positivo) e o grupo 6 foi o controle

negativo, constituído pela solução aquosa de Tween 80 a 0,1%, a qual foi utilizada no processo de diluição dos óleos essenciais.

- Grupo 1: Óleo essencial ou blenda mais ativa (valor de CIM)
- Grupo 2: Óleo essencial ou blenda mais ativa (5 vezes o valor da CIM)
- Grupo 3: Óleo essencial ou blenda mais ativa (10 vezes o valor da CIM)
- Grupo 4: Hipoclorito de sódio 5,25% (controle positivo)
- Grupo 5: Clorexidina gel 2% + soro fisiológico (controle positivo)
- Grupo 6: Solução aquosa de Tween 80 a 0,1% (controle negativo)

A solução de NaOCl 5,25% e a clorexidina gel 2% foram manipuladas pela Drogal Farmácia de Manipulação Ltda. (Piracicaba, SP, Brasil). Devido à instabilidade do NaOCl, o mesmo foi manipulado em pequenas proporções, 24 h antes de sua utilização. A clorexidina gel foi preparada em pH entre 5,0 e 8,0 para aumentar sua estabilidade química (Bourreau et al., 2015).

Os canais radiculares de todos os espécimes foram instrumentados com o sistema Reciproc R25, 21 mm (VDW GmbH, Munique, Alemanha), utilizando a solução irrigadora correspondente ao seu grupo. O preparo químico-mecânico (PQM) foi realizado por um mesmo operador, com a seguinte cinemática: o instrumento foi acionado em motor VDW-Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) em três ciclos de penetração/retrocesso, de forma a aprofundar o preparo em cada ciclo. A primeira introdução até o terço médio, com a troca da solução irrigadora e subsequente exploração com lima K #15 até o comprimento real do dente. Assim, a mesma sequência foi realizada até a lima mecanizada alcançar o terço apical e depois até o forame apical (comprimento real do dente – 15 mm). Em cada ciclo, o instrumento era limpo em gaze esterilizada e o canal radicular irrigado com 5 mL da solução irrigadora, totalizando 15 mL de solução ao término da instrumentação. A irrigação foi realizada com seringas plásticas descartáveis (Ultradent) de 10 mL e pontas de irrigação Endo-EZE (Ultradent) com diâmetro de 30G e saída lateral da substância. A aspiração foi feita por meio de cânulas de aspiração acopladas à bomba odontológica à vácuo. A agulha de irrigação foi posicionada a 2 mm aquém do comprimento de trabalho, utilizadas com movimentos de avanço e retrocesso com amplitude de 2 mm.

Para a irrigação com clorexidina gel, esta era inserida no interior do canal radicular antes da introdução do instrumento recíprocante. Após cada inserção do instrumento, o gel era removido com irrigação ativa com soro fisiológico. A quantidade total durante o preparo de cada dente foi 3 mL da clorexidina gel (1 mL em cada ciclo) e 12 mL de soro fisiológico (4 mL em cada ciclo).

Os grupos irrigados com hipoclorito de sódio e clorexidina gel foram neutralizados após a instrumentação completa do canal, a fim de evitar ação residual das substâncias químicas nas coletas microbiológicas (Berber et al, 2006). Assim, os canais radiculares foram irrigados com 1 mL de neutralizante específico para cada substância, sendo o tiosulfato de sódio 0,6% para o hipoclorito de sódio e Tween 80 a 0,5% + lecitina de soja 0,07% para a clorexidina gel (Siqueira et al., 1998). As soluções de tiosulfato de sódio 0,6% e Tween 80 a 0,5% + lecitina de soja 0,07% foram manipuladas pela Drogal Farmácia de Manipulação Ltda. (Piracicaba, SP, Brasil).

Ao final, os canais radiculares preparados foram irrigados com 10 mL de solução fisiológica estéril e secos com pontas de papel absorvente. No interior da câmara de fluxo laminar foram realizadas coletas do canal radicular imediatamente após a instrumentação endodôntica, seguindo a mesma metodologia aplicada para a confirmação da contaminação. Assim, amostras do conteúdo dos canais radiculares foram coletadas antes e imediatamente após o PQM. Para a obtenção dos valores referentes às UFC/mL foi necessário multiplicar por 1000 vezes e 100 vezes o número de UFC obtidas na contagem das placas antes e após o PQM, respectivamente. Ou seja, como foi utilizada na contagem antes do PQM a diluição a  $10^{-2}$ , o valor a ser multiplicado correspondendo a essa diluição é 100, para a contagem após o PQM em que foi utilizada a diluição  $10^{-1}$ , o valor a ser multiplicado é 10. A alíquota plaqueada foi de 100  $\mu$ L, ou seja, 10 vezes menor que 1,0 mL. A mediana das 3 placas foi utilizada como valor final da contagem. Assim, a mediana das três placas foi multiplicada por 1000 nas placas antes do PQM e 100 nas depois do PQM (Berber et al., 2006).

Os valores das contagens antes e depois do PQM foram tabulados para ser calculada a porcentagem de redução das UFC com o PQM e os dados foram submetidos à análise estatística.

#### 4.10.2 Avaliação da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras nos túbulos dentinários

Cada raiz foi fixada em uma máquina de corte de precisão (ISOMET, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA), onde foram realizadas fatias no sentido transversal de 1 mm de espessura de cada terço radicular, a partir de 2 mm do ápice radicular. Assim, de cada amostra radicular foram obtidas 3 fatias de dentina, que foram inseridas individualmente em poços de microplaca e corados com 100  $\mu$ L da solução Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA). Após aplicação do corante, a placa foi fechada e envolta em papel alumínio, a fim de proporcionar a difusão dos corantes no espécime sob ausência de luz e em temperatura ao redor de 30 °C por 20 min, segundo recomendações do fabricante.

O Kit Live/Dead® BacLight Bacterial Viability consiste na combinação de SYTO-9 e iodeto de propídio. O SYTO-9 é um corante fluorescente de ácido nucléico que marca em verde micro-organismos viáveis. O iodeto de propídio é um corante fluorescente de ácido nucléico que marca em vermelho e penetra apenas as bactérias com membranas danificadas, assim, apenas as células não viáveis são visualizadas.

A fluorescência dos micro-organismos corados foi observada por MCVL (Leica TCS-SP5 AOBS, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha), em aumento de 63x NA1.4, em lente de imersão ao óleo. Foi utilizado laser de argônio 488 e laser HeNe 543. O comprimento de onda de emissão foi 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para iodeto de propídio. Leituras de 10  $\mu$ m de profundidade (0,5  $\mu$ m step size, sendo 20 camadas por imagem). As imagens foram obtidas por meio do *software* Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha) com resolução de 2048 x 2048 *pixels*.

As imagens geradas de cada terço radicular foram transferidas para o *software* ImageJ® (Research Services Branch, Bethesda, MD, EUA), para análise quantitativa, totalizando três imagens para cada dente. Cada imagem teve a área delimitada em  $\mu$ m<sup>2</sup> e foi realizada a contagem de *pixels* corados em verde, vermelho e a sobreposição de verde + vermelho. Em seguida, foi calculada a proporção da fluorescência vermelha em relação à fluorescência verde + vermelho, indicando a

proporção de células mortas para cada agente irrigador. Estes dados foram tabulados e avaliados por meio de testes estatísticos, utilizando o *Software* SPSS 20.0 ( $p < 0,05$ ).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais estudados frente aos endopatógenos orais

Os óleos essenciais que inibiram o crescimento de *E. faecalis* e *C. albicans* nas menores concentrações foram *C. martinii*, *E. caryophyllata*, *L. sidoides*, *O. gratissimum*, *P. microphyllus*, *S. chamaecyparissus*, *T. riparia* e *C. sativum*. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) conferidos por estes óleos estão apresentados na Tabela 2. As demais espécies medicinais estudadas apresentaram valores de CIM superiores a 1 mg/mL. Foram também determinadas as concentrações bactericidas e fungicidas mínimas para os óleos essenciais mais efetivos frente à ambos micro-organismos, sendo estes *C. martinii*, *L. sidoides* e *T. riparia* (Tabela 3).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM – mg/mL) dos óleos essenciais frente aos micro-organismos estudados.

<b>Espécie Medicinal</b>	<b><i>E. faecalis</i> ATCC 29212</b>	<b><i>E. faecalis</i> IC</b>	<b><i>C. albicans</i> CBS 562</b>	<b><i>C. albicans</i> IC</b>
<i>C. martinii</i>	0,7	*	0,4	0,2
<i>E. caryophyllata</i>	*	*	0,4	0,5
<i>L. sidoides</i>	0,6	0,8	0,2	0,4
<i>O. gratissimum</i>	*	*	0,4	0,5
<i>P. microphyllus</i>	0,8	0,6	*	*
<i>S. chamaecyparissus</i>	*	1,0	*	*
<i>T. riparia</i>	0,3	0,3	*	*
<i>C. sativum</i>	0,1	*	0,9	1,0

\* CIM > 1 mg/mL

Os resultados da Tabela 3 mostram que o óleo essencial de *T. riparia* apresentou atividade bactericida contra as cepas de *E. faecalis* a 0,3 mg/mL, enquanto *C. martinii* e *L. sidoides* foram fungicidas para *C. albicans*, ambos a 0,4 mg/mL.

A partir dos resultados de atividade antimicrobiana foram testadas combinações (blendas) dos três óleos essenciais mais ativos (menores valores de CIM). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3. Concentração bactericida e fungicida mínimas (CBM/CFM - mg/mL) dos óleos essenciais frente aos micro-organismos estudados.

Micro-organismo	<i>C. martinii</i>	<i>L. sidoides</i>	<i>T. riparia</i>
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,9	*	0,3
<i>E. faecalis</i> IC	1,0	*	0,3
<i>C. albicans</i> CBS 562	0,4	0,4	*
<i>C. albicans</i> IC	0,4	0,4	*

\* Atividade > 1 mg/mL

Tabela 4. Atividade antimicrobiana (CIM e CBM/CFM - mg/mL) das blendas dos óleos essenciais frente aos micro-organismos estudados.

	Micro-organismo	Blenda 1	Blenda 2	Blenda 3	Blenda 4
CIM	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,4	0,4	0,9	0,5
	<i>E. faecalis</i> IC	0,3	0,3	0,8	0,3
	<i>C. albicans</i> CBS 562	0,2	0,2	0,2	0,1
	<i>C. albicans</i> IC	0,3	0,3	0,3	0,3
CBM	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	*	0,4	0,9	0,6
	<i>E. faecalis</i> IC	*	*	0,9	0,4
CFM	<i>C. albicans</i> CBS 562	0,2	0,6	0,6	0,2
	<i>C. albicans</i> IC	0,6	0,6	0,2	0,6

\* Atividade > 1 mg/mL; Blenda 1: *C. martinii*, *L. sidoides* e *T. riparia*; Blenda 2: *L. sidoides* e *T. riparia*; Blenda 3: *C. martinii* e *L. sidoides*; Blenda 4: *C. martinii* e *T. riparia*

## 5.2 Formação de biofilme pelos micro-organismos na presença dos óleos essenciais ativos e suas blendas

Os três óleos essenciais mais ativos, ou seja, *C. martinii*, *L. sidoides* e *T. riparia*, e suas blendas foram também avaliados quanto à inibição da formação do biofilme pelos micro-organismos isoladamente, após 48 h de incubação. Os resultados estão dispostos na Figura 1 para o biofilme do *E. faecalis* IC, Figura 2 para o biofilme de *E. faecalis* ATCC 29212, Figura 3 para o biofilme de *C. albicans* IC e Figura 4 para *C. albicans* CBS 562. O hipoclorito de sódio 2,5% foi utilizado como controle.

## 5.3. Rendimento dos óleos essenciais

Foi calculado o rendimento dos óleos essenciais mais ativos com base no peso da planta seca. Para o óleo essencial de *C. martinii* foi 1,36% e para o óleo de *T. riparia* 1,8%.

## 5.4 Composição química dos óleos essenciais

A caracterização da composição química dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os constituintes mais relevantes foram identificados por comparação dos espectros de massas com os da biblioteca eletrônica NIST, bem como por comparação dos dados de Índice de Retenção e espectros de massas descritos na literatura (Adams, 1995), coletados em condições cromatográficas similares.

A análise do óleo essencial de *C. martinii* realizada por CG-EM revelou como constituinte majoritário o trans-geraniol, que correspondeu a 85,39% de sua composição (Figura 5 e Tabela 5).

A Figura 6 apresenta o cromatograma do óleo essencial *T. riparia*. Através da Tabela 6 verifica-se que, com exceção do analito 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno (21,02%), a maioria dos compostos majoritários presentes no óleo não puderam ser identificados. Porém, em função da fragmentação e da massa molar, pode-se inferir que sejam: um sesquiterpeno oxigenado de massa molar 222 ( $M = 222$ ) índice de retenção 1693 (29,86%), um diterpeno de massa molar 288 ( $M = 288$ ) índice de retenção 1985 (11,10%) e outro diterpeno de massa molar 288 ( $M = 288$ ) índice de retenção 2179 (10,35%). As Figuras 7, 8 e 9 apresentam os espectros de massas dos referidos analitos.

Figura 1. Inibição da formação de biofilme pelo *E. faecalis* IC na presença de óleos essenciais em diferentes concentrações (mg/mL), após 48 h de incubação.

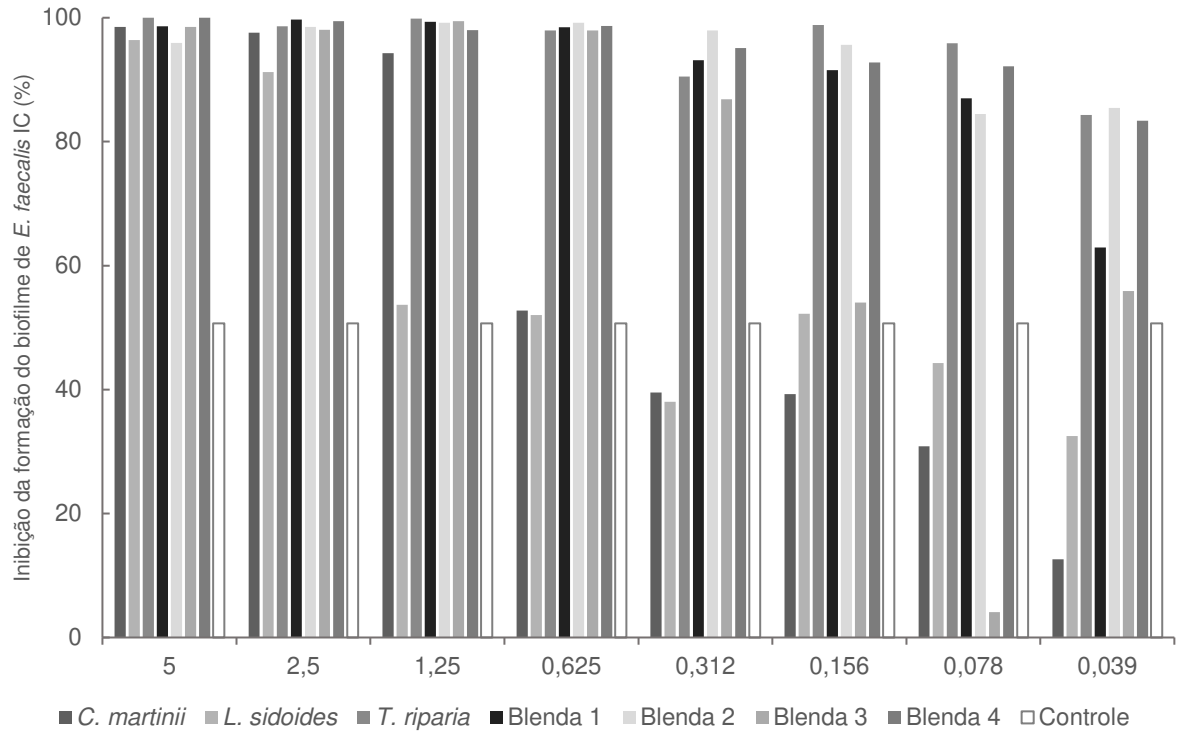


Figura 2. Inibição da formação de biofilme pelo *E. faecalis* ATCC 29212 na presença de óleos essenciais em diferentes concentrações (mg/mL), após 48 h de incubação.

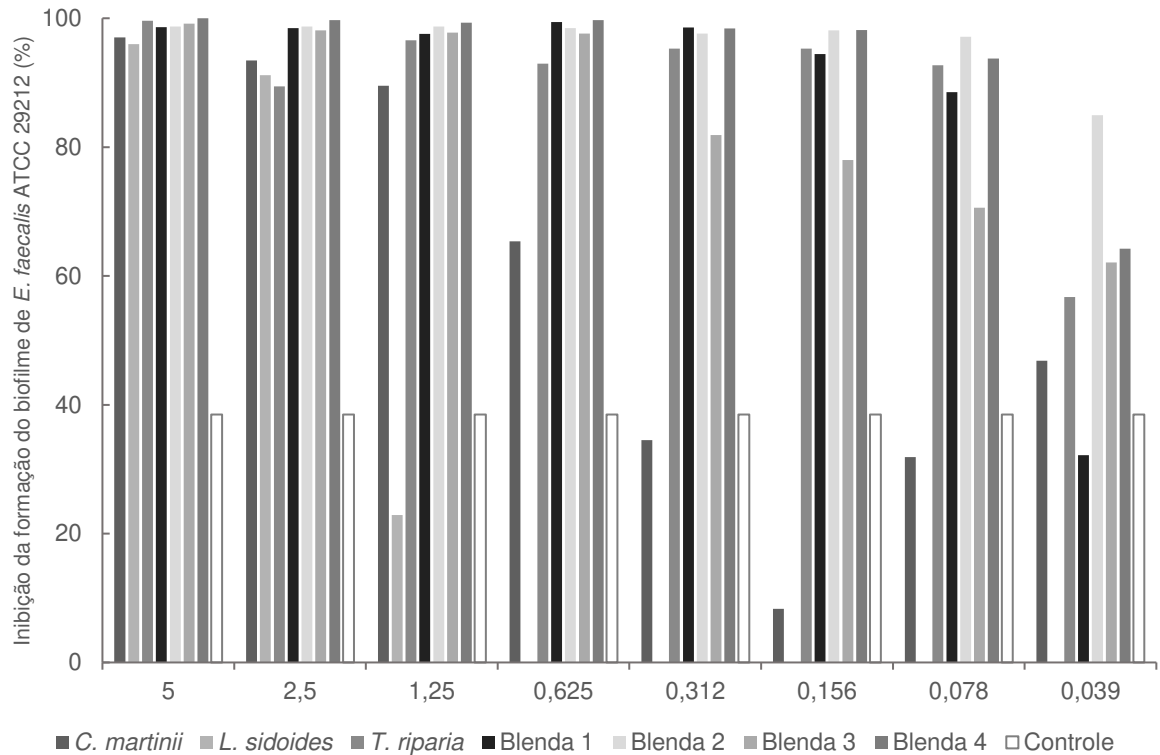


Figura 3. Inibição da formação de biofilme pelo *C. albicans* IC na presença de óleos essenciais em diferentes concentrações (mg/mL), após 48 h de incubação.

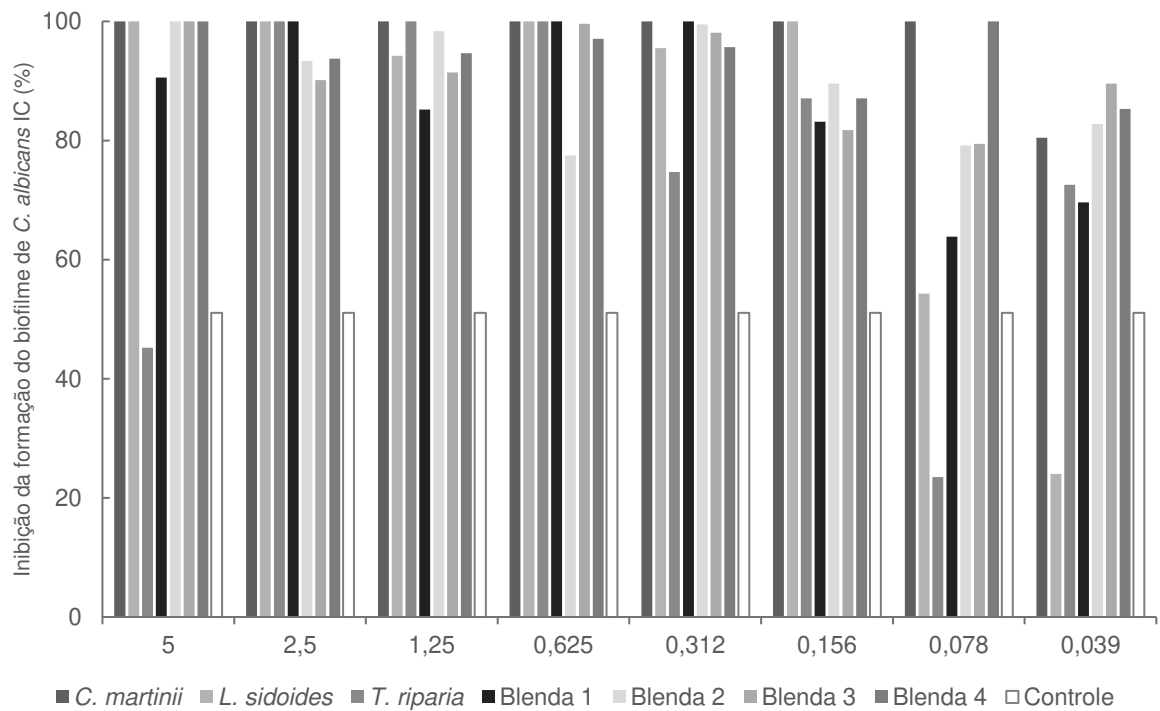


Figura 4. Inibição da formação de biofilme pelo *C. albicans* CBS 562 na presença de óleos essenciais em diferentes concentrações (mg/mL), após 48 h de incubação.

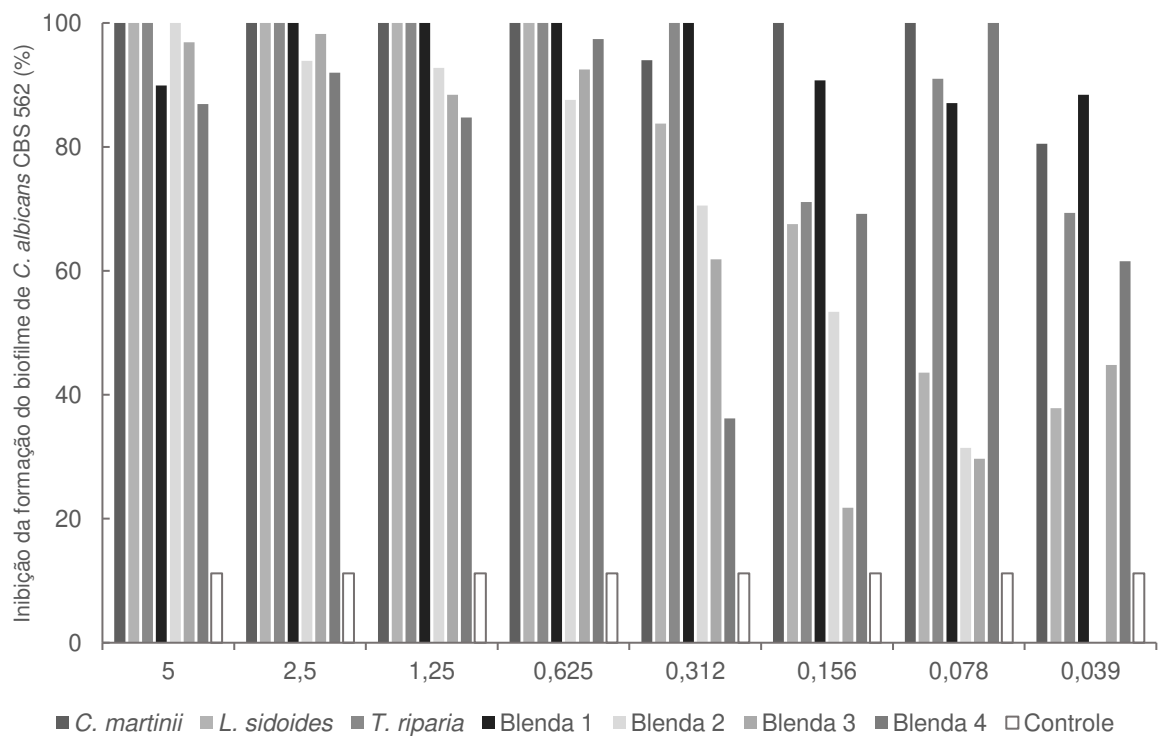
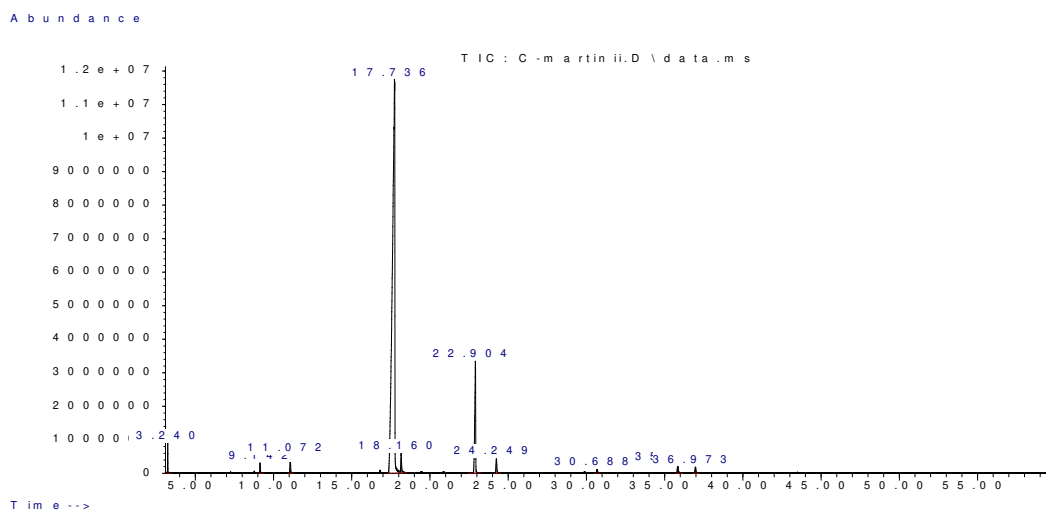


Figura 5. Cromatograma do óleo essencial de *C. martinii*Tabela 5. Compostos identificados, tempo de retenção (tR), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) no óleo essencial de *C. martinii*

t <sub>R</sub> (min)	IR <sup>(a)</sup>	Identificação	% rel. <sup>(b)</sup>
9,15	1047	trans-ocimeno	0,52
17,74	1263	trans-geraniol	85,39
18,16	1273	geranial	1,52
22,90	1386	acetato de geranila	9,05
24,25	1419	trans-cariofileno	1,04

Notas: a) índice de retenção; b) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

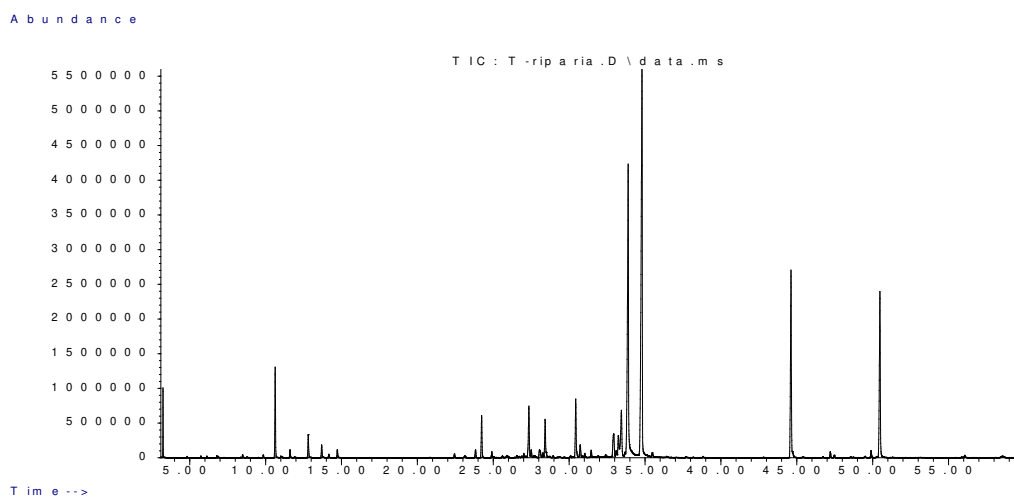
Figura 6: Cromatograma do óleo essencial de *T. riparia*

Tabela 6. Analitos identificados no óleo essencial de *T. riparia*.

$t_R$ (min)	IR <sup>(a)</sup>	Identificação	% rel. <sup>(b)</sup>
10,63	1089	Fenchona	3,84
11,61	1114	acetato de fenchila	0,36
12,81	1144	Cânfora	1,09
13,70	1166	Borneol	0,60
14,73	1191	alfa-terpineol	0,38
23,83	1409	alfa-gurjuneno	0,40
24,24	1419	trans-cariofileno	2,15
27,35	1496	Viridifloreno	3,11
27,51	1500	trans-beta-guaieno	0,43
28,05	1514	gama-cadineno	0,74
28,42	1523	delta-cadineno	2,26
30,44	1576	M = 222 <sup>(c)(d)</sup>	3,36
32,94	1642	M = 204 <sup>(d)</sup>	2,09
33,24	1651	M = 218 <sup>(d)</sup>	1,42
33,45	1656	M = 222 <sup>(d)</sup>	3,85
33,89	1668	14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	21,02
34,80	1693	M = 222 <sup>(d)</sup>	29,86
44,62	1985	M = 288 <sup>(d)</sup>	11,10
50,48	2179	M = 288 <sup>(d)</sup>	10,35

Notas: a) índice de retenção; b) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; c) massa molar; d) n.i. – não identificado.

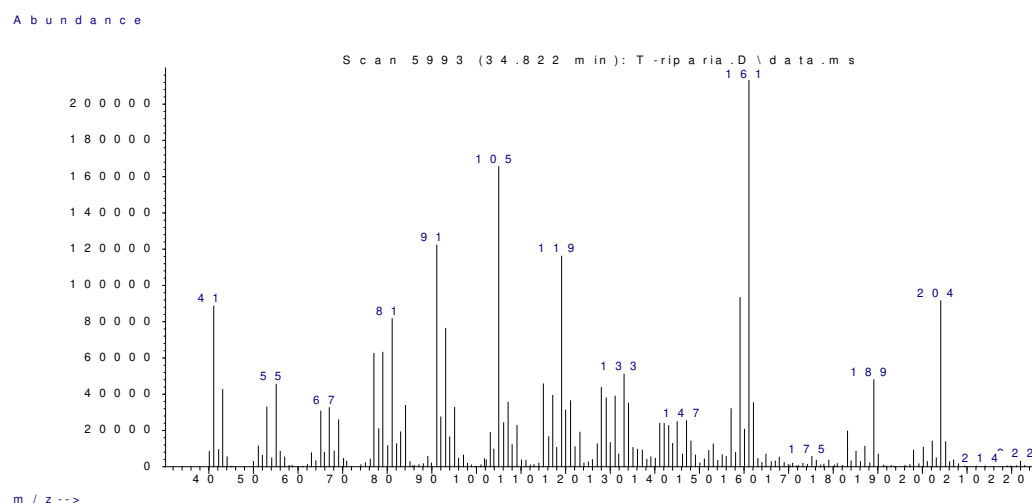
Figura 7. Espectro de massas do analito com  $t_R = 34,80$  min (sesquiterpeno de M= 222)



Figura 8. Espectro de massas do analito com  $t_R = 44,62$  min (diterpeno de  $M = 288$ )

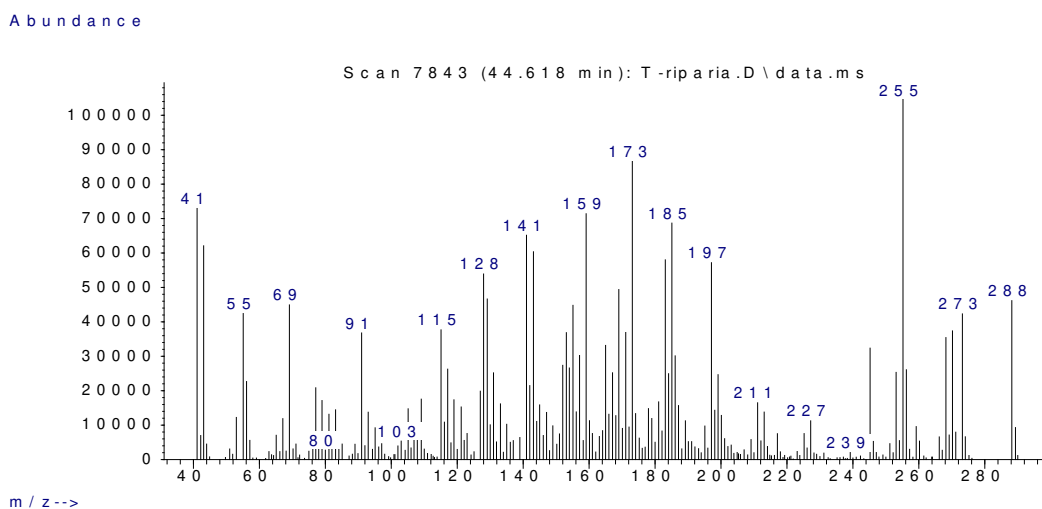
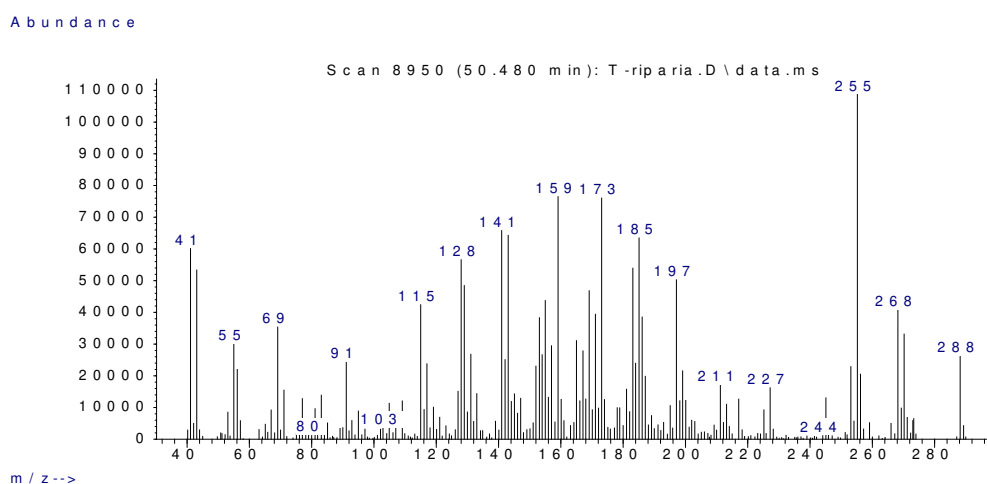


Figura 9. Espectro de massas do analito com  $t_R = 50,48$  min (diterpeno de  $M = 288$ )



## 5. 5. Citotoxicidade *in vitro* dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia*

Os óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* foram analisados individualmente quanto à sua toxicidade frente a células HaCaT de queratinócitos humanos, já que a blenda destes óleos foi o composto mais ativo nos testes de atividade antimicrobiana. Os resultados de TGI (Inibição Total do Crescimento) foram de 9,52 µg/mL e 84,7 µg/mL, respectivamente, para os óleos de *C. martinii* e *T. riparia*.

Com base nos valores TGI, os óleos essenciais selecionados foram classificados como de atividade moderada (*C. martinii* - 6,25 µg/mL < TGI < 15 µg/mL) e inativo (*T. riparia* - TGI > 50 µg/mL).

## 5.6 Análise da tensão superficial e densidade

Os óleos essenciais solubilizados em solução aquosa de Tween 80 0,1% foram analisados quanto a tensão superficial e densidade. Os dados referentes às leituras estão descritos na Tabela 7. A análise de variância (ANOVA) demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os valores de tensiometria das soluções ( $p < 0,05$ ), sendo aplicado o teste de Tukey. Os menores valores foram observados para a solução referente ao óleo de *C. martinii* (28,8 mN/m) seguido pelo de *T. riparia* (36,1 mN/m).

Tabela 7. Tensão superficial (mN/m) e densidade (g/mL)

	<b><i>C. martinii</i> + Tween 80 0,1%</b>	<b><i>T. riparia</i> + Tween 80 0,1%</b>	<b>Soro fisiológico</b>	<b>NaOCl 2,5%</b>	<b>Tween 80 0,1%</b>
Tensão superficial	29,8± 0,01a	36,1± 0,1b	73,7± 0,1e	67,69± 0,05d	36,8± 0,22c
Densidade	0,987	0,998	0,998	1,021	0,988

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

## 5.7 Ação antimicrobiana das soluções irrigadoras *ex vivo*

Os canais radiculares e túbulos dentinários foram contaminados com os micro-organismos *E. faecalis* e *C. albicans*, conforme descrito em 4.10. A contaminação foi comprovada por análise por MEV (Figuras 10 e 11) e por MCVL (Figuras 12- terço apical, Figura 13- terço médio, Figura 14 – terço apical). Foram geradas imagens em MCVL identificando a fluorescência verde (A), vermelha (B) e a sobreposição das fluorescências verde + vermelha (C). A imagem D ilustra os túbulos dentinários em azul.

Em seguida, os canais radiculares contaminados foram submetidos a irrigação com soluções da blenda dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* em Tween 80 0,1%, em diferentes concentrações. A seleção das concentrações das blendas foi baseada no maior valor de CIM e CBM/CFM obtidos com todas as cepas

microbianas testadas (0,5 mg/mL). A partir desta, as próximas concentrações selecionadas foram de 5 vezes e 10 vezes este valor. Portanto, as soluções irrigadoras compostas pelos óleos essenciais mais ativos, utilizadas nos ensaios *ex vivo* foram: 1. Blenda dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL; 2. Blenda dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL e 3. Blenda dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL.

#### **5.6.1 Contagem de micro-organismos do conteúdo coletado dos canais radiculares antes e após o preparo químico-mecânico**

A partir dos valores de contagem de UFC de *E. faecalis* e *C. albicans* antes (confirmação da contaminação) e após o tratamento com a associação de instrumentação e soluções irrigadoras (Tabelas 8 e 9) foram calculadas as porcentagens de redução das UFC após o PQM no canal radicular principal em cada amostra (dente).

De acordo com o descrito em 4.10.1, foi utilizada a mediana dos valores para o cálculo da redução das UFC. Assim, foi empregado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e método de Dunn para a análise estatística (Tabela 10).

Por meio dos resultados pode-se observar que houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem de *E. faecalis* e *C. albicans* em todos os grupos estudados, após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Tabela 10).

#### **5.6.2 Avaliação da presença de micro-organismos nos túbulos dentinários por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)**

A partir dos dados de contagem da fluorescência nas imagens obtidas das fatias de dentina, conforme descrito em 4.10.2, foi calculado o percentual de eliminação microbiana para cada solução irrigadora por  $\mu\text{m}^2$  de dentina. Os valores de redução microbiana apresentaram distribuição normal ao teste de Shapiro-Wilk, sendo então aplicado o teste ANOVA One-Way ( $p < 0,05$ ). Uma vez que houve

diferença estatística entre os grupos, foi aplicado o teste de Tukey para identificar essa diferença. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Foi aplicado o teste ANOVA Two-way para análise da ação das soluções irrigadoras nos terços das raízes. Os resultados mostraram que quando foi analisada a ação de cada solução irrigadora nos terços radiculares, houve diferença significativa somente no grupo irrigado com clorexidina gel + soro fisiológico, onde este foi mais efetivo no terço cervical e apical ( $p < 0,05$ ). As demais soluções irrigadoras não apresentaram diferença estatisticamente significativa de ação nos terços radiculares ( $p > 0,05$ ). Porém, a diferença foi significativa quando analisadas as soluções irrigadoras mais efetivas em cada terço radicular, a qual foi identificada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12).

Figura 10. Comprovação por MEV da contaminação microbiana no interior dos túbulos dentinários radiculares após o período de inoculação.

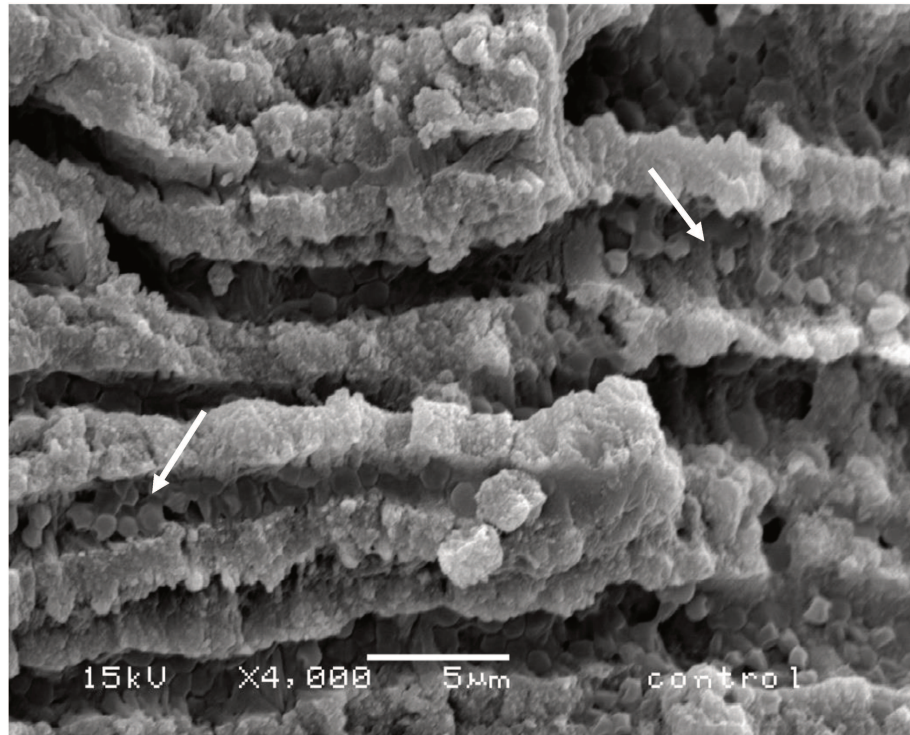


Figura 11 - Comprovação por MEV da contaminação microbiana na luz do canal radicular principal após o período de inoculação.

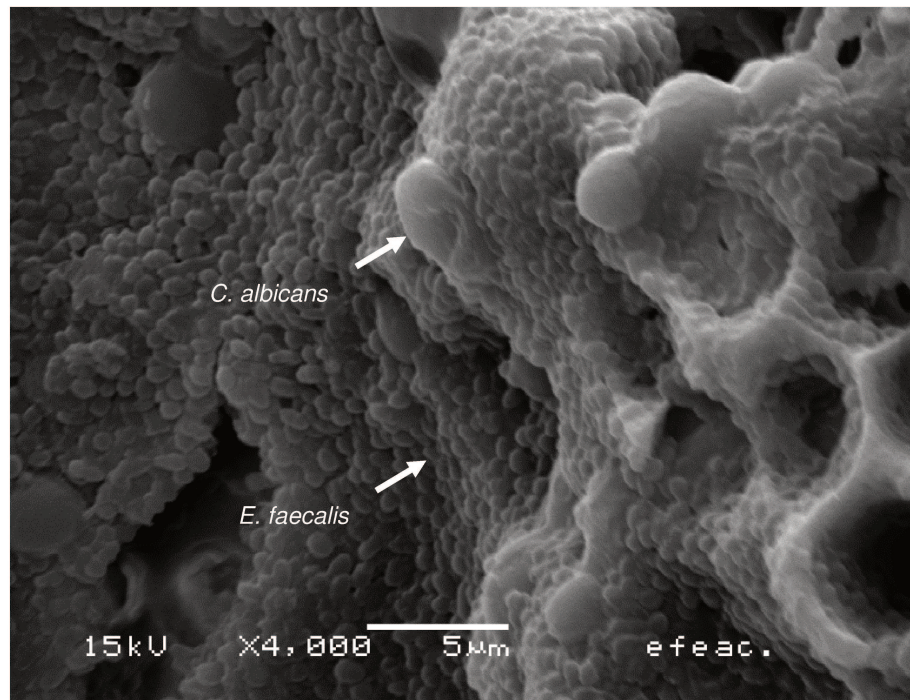




Figura 12: Confirmação por MCVL da contaminação dos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

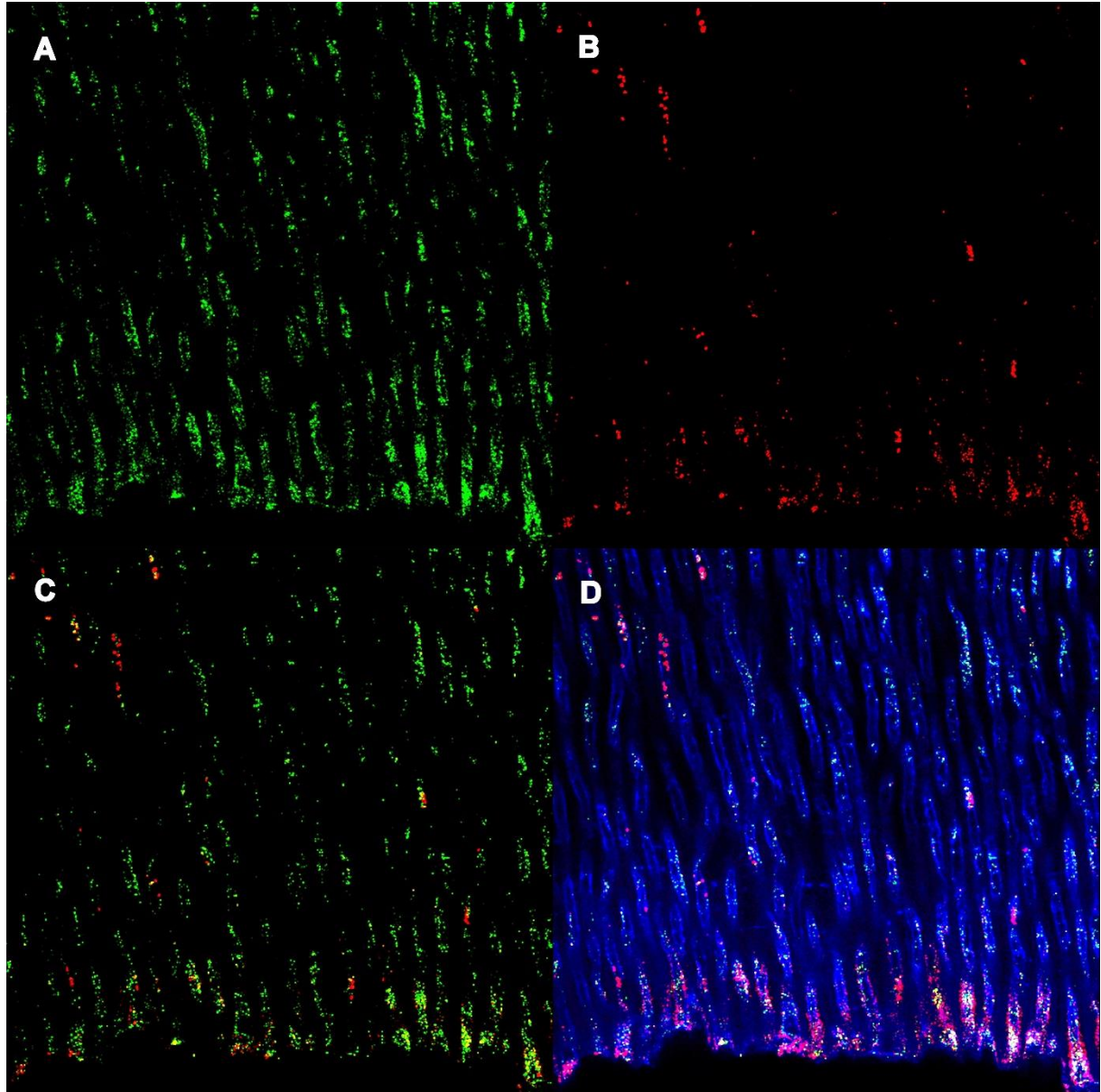


Figura 13: Confirmação por MCVL da contaminação dos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

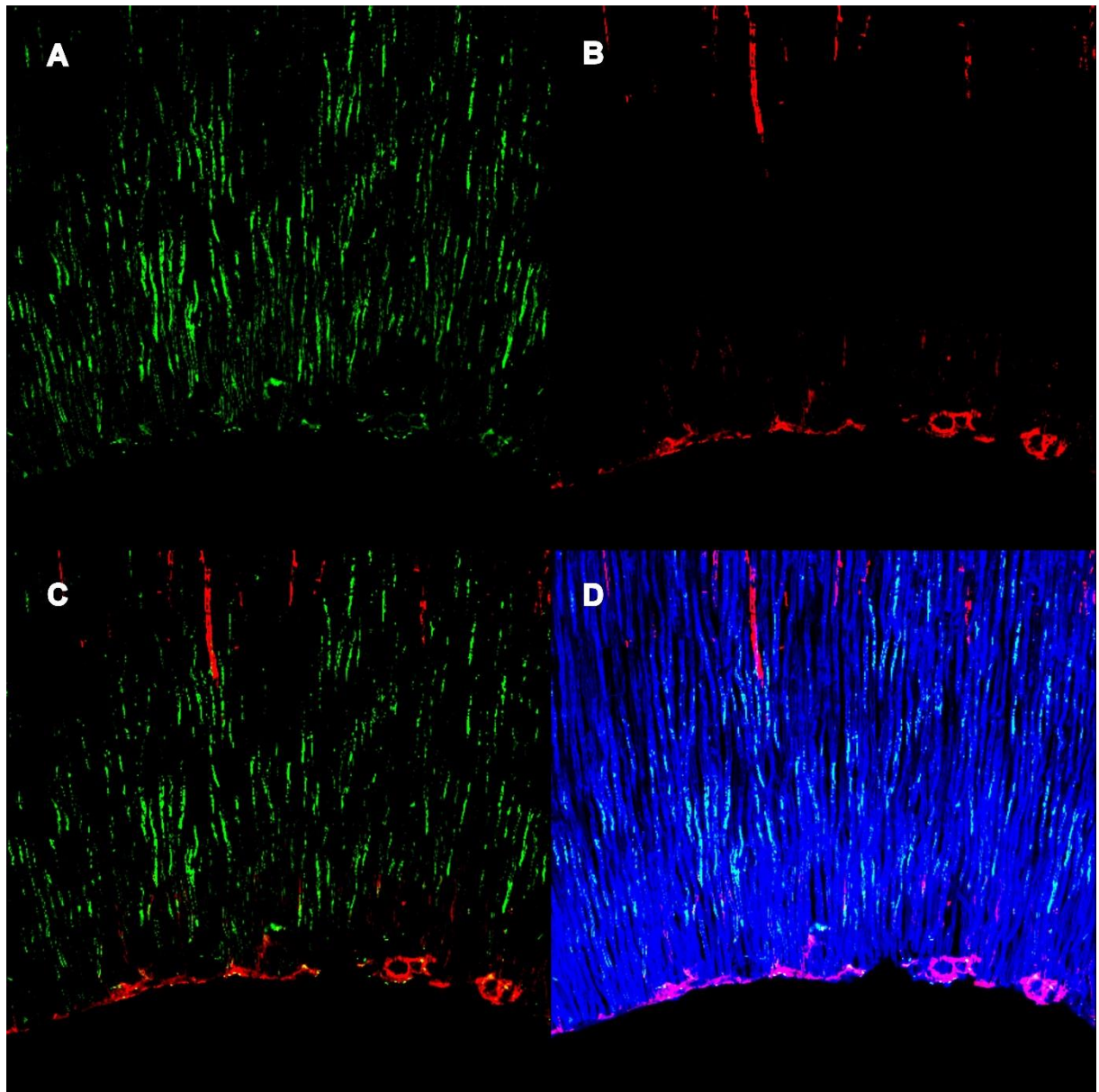


Figura 14: Confirmação por MCVL da contaminação dos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

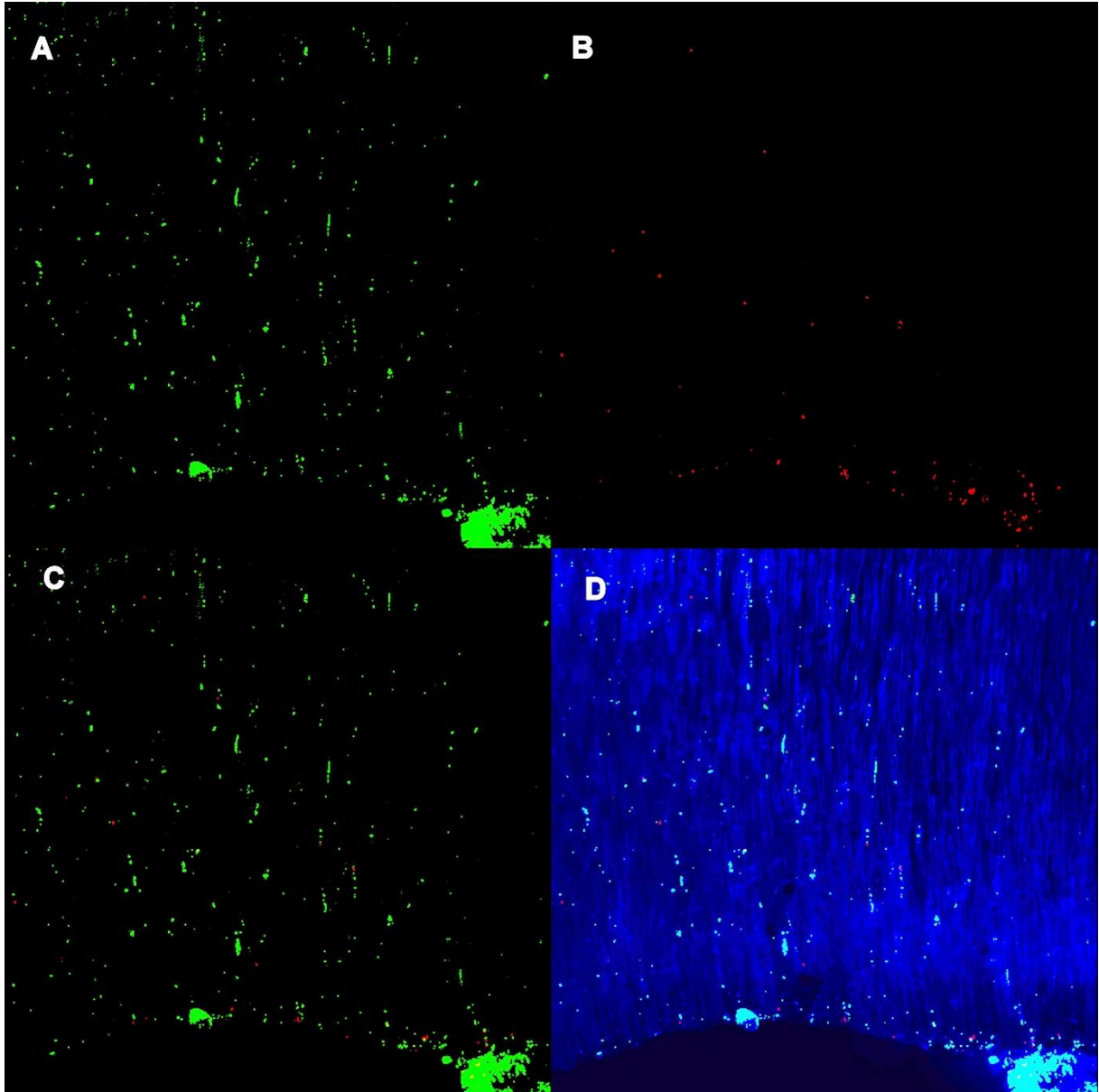




Tabela 8. Contagem de *E. faecalis* (UFC/mL x 10<sup>5</sup>), antes e após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares.

Amostra	Antes	Depois	Redução	% redução
Grupo 1	26,92	0,14	26,77	99,47
	43,11	3,51	39,59	91,85
	41,91	2,47	39,44	94,11
	35,73	2,38	33,35	93,34
	55,49	2,64	52,85	95,25
	29,11	2,04	27,07	92,99
Grupo 2	42,61	0,69	41,92	98,38
	17,69	0,73	16,96	95,86
	39,05	0,54	38,51	98,61
	19,25	1,41	17,84	92,70
	34,5	0,64	33,86	98,14
	19,25	0,70	18,55	96,36
Grupo 3	34,64	0,16	34,48	99,53
	29,38	1,72	27,66	94,16
	14,87	0,78	14,09	94,76
	51,07	0,19	50,88	99,62
	34,87	1,26	33,62	96,40
	65,07	0,98	64,10	98,50
Grupo 4	4,66	0,01	4,65	99,74
	23,62	ND	23,62	100,00
	22,13	ND	22,13	100,00
	5,86	ND	5,86	100,00
	16,05	ND	16,05	100,00
	9,27	ND	9,27	100,00
Grupo 5	14,87	ND	14,87	100,00
	34,83	ND	34,83	100,00
	7,25	ND	7,25	100,00
	4,00	ND	4,00	100,00
	18,58	ND	18,58	100,00
	23,33	ND	23,33	100,00
Grupo 6	44,27	0,97	43,30	97,80
	3,86	0,27	3,60	93,21
	33,67	0,94	32,72	97,20
	32,44	0,87	31,57	97,33
	28,76	0,9	27,86	96,89
	12,82	0,86	11,96	93,32

ND= Não detectado

Tabela 9. Contagem de *C. albicans* (UFC/mL x 10<sup>5</sup>), antes e após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares.

Amostra	Antes	Depois	Redução	% redução
Grupo 1	204	3	201	98,53
	1130	4	1126	99,65
	2410	21	2389	99,13
	1094	9	1085	99,18
	3139	11	3128	99,65
	373	ND	373	100,00
Grupo 2	3357	2	3355	99,94
	633	5	628	99,21
	232	ND	232	100,00
	232	1	231	99,57
	695	ND	695	100,00
	443	ND	443	100,00
Grupo 3	2145	ND	2145	100,00
	3021	84	2937	97,22
	474	ND	474	100,00
	2477	4	2473	99,84
	1902	53	1849	97,21
	2369	3	2366	99,87
Grupo 4	138	ND	138	100,00
	310	ND	310	100,00
	665	ND	665	100,00
	126	ND	126	100,00
	680	ND	680	100,00
	149	ND	149	100,00
Grupo 5	629	ND	629	100,00
	1299	ND	1299	100,00
	185	ND	185	100,00
	182	ND	182	100,00
	35	ND	35	100,00
	291	ND	291	100,00
Grupo 6	790	10	780	98,73
	82	5	77	93,90
	387	1	386	99,74
	429	10	419	97,67
	782	16	766	97,95
	336	8	328	97,62

ND= Não detectado

Tabela 10. Porcentagem de redução de UFC/mL após instrumentação em associação com diferentes soluções irrigadoras.

	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
Blenda <i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 0,5 mg/mL	94,50 ± 2,69 <b>b</b>	99,36 ± 0,52 <b>ab</b>
Blenda <i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 2,5 mg/mL	96,68 ± 2,25 <b>b</b>	99,79 ± 0,33 <b>ab</b>
Blenda <i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 5,0 mg/mL	97,16 ± 2,40 <b>ab</b>	99,02 ± 1,40 <b>ab</b>
Hipoclorito de sódio 5,25%	99,95 ± 0,10 <b>ab</b>	100,00 ± 0,00 <b>a</b>
Clorexidina gel 2%	100,00 ± 0,00 <b>a</b>	100,00 ± 0,00 <b>a</b>
Tween 80 a 0,1%	95,96 ± 2,11 <b>b</b>	97,60 ± 1,98 <b>b</b>

Letras distintas indicam diferença estatística significativa (p < 0,05)

Tabela 11. Proporção de eliminação de micro-organismos por  $\mu\text{m}^2$  de dentina radicular.

Solução irrigadora	n	% Eliminação
<i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 0,5 mg/mL	6	40,52 ± 17,21 <b>b</b>
<i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 2,5 mg/mL	6	41,40 ± 12,47 <b>b</b>
<i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 5,0 mg/mL	6	52,93 ± 16,57 <b>ab</b>
Hipoclorito de sódio 5,25%	6	46,50 ± 9,60 <b>ab</b>
Clorexidina gel 2%	6	67,50 ± 14,53 <b>a</b>
Tween 80 a 0,1%	6	12,91 ± 4,61 <b>c</b>

Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p < 0,05)

Tabela 12. Proporção de eliminação de micro-organismos por  $\mu\text{m}^2$  de dentina radicular nos diferentes terços radiculares.

	Terço cervical	Terço médio	Terço apical
<i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 0,5 mg/mL	39,67 ± 25,14 <b>bc</b>	42,59 ± 30,74 <b>ab</b>	43,27 ± 20,77 <b>ab</b>
<i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 2,5 mg/mL	43,53 ± 18,58 <b>abc</b>	38,90 ± 29,41 <b>ab</b>	46,81 ± 19,86 <b>ab</b>
<i>C. martinii</i> e <i>T. riparia</i> 5,0 mg/mL	54,09 ± 27,13 <b>ab</b>	49,99 ± 16,95 <b>a</b>	43,77 ± 23,67 <b>ab</b>
Hipoclorito de sódio 5,25%	45,00 ± 19,43 <b>abc</b>	45,96 ± 22,66 <b>ab</b>	53,86 ± 19,73 <b>a</b>
Clorexidina gel 2%	78,29 ± 17,21 <b>Aa</b>	47,48 ± 19,08 <b>Bab</b>	68,59 ± 25,27 <b>ABa</b>
Tween 80 a 0,1%	10,82 ± 7,10 <b>c</b>	13,41 ± 6,43 <b>b</b>	15,95 ± 8,36 <b>b</b>

Letras maiúsculas se referem às diferenças intra-grupos e letras minúsculas diferenças inter-grupos no mesmo terço radicular (p < 0,05)

As figuras a seguir ilustram as imagens de um espécime de cada grupo experimental, sendo as correspondentes ao Grupo 1 dispostas nas Figuras 15 (terço cervical), 16 (terço médio) e 17 (terço apical); Grupo 2 nas Figuras 18 (terço cervical), 19 (terço médio) e 20 (terço apical); Grupo 3 nas Figuras 21 (terço cervical), 22 (terço médio) e 23 (terço apical); Grupo 4 nas Figuras 24 (terço cervical), 25 (terço médio) e 26 (terço apical); Grupo 5 nas Figuras 27 (terço cervical), 28 (terço médio) e 29 (terço apical) e Grupo 6 nas Figuras 30 (terço cervical), 31 (terço médio) e 32 (terço apical).

Figura 15: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

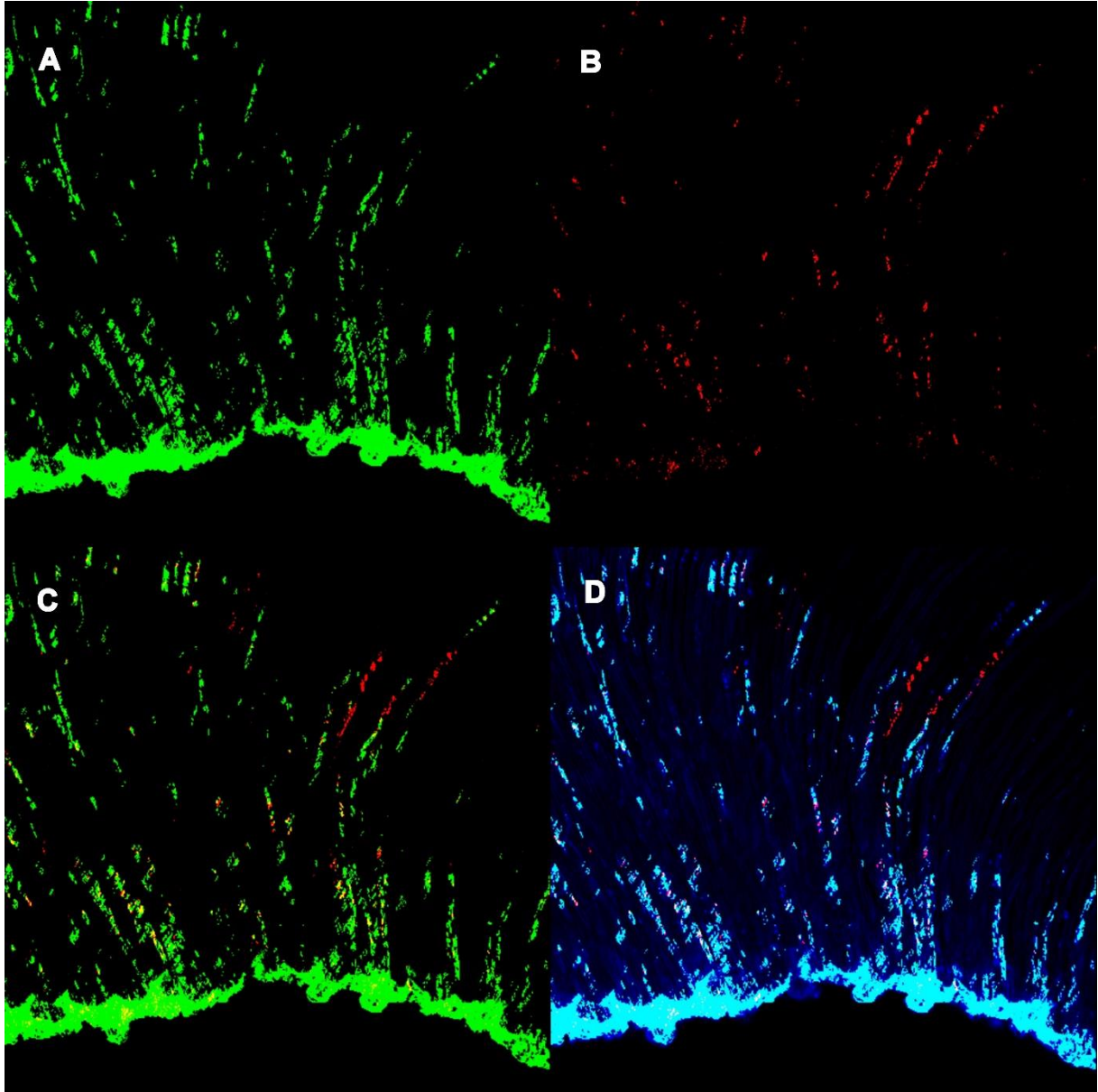


Figura 16: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

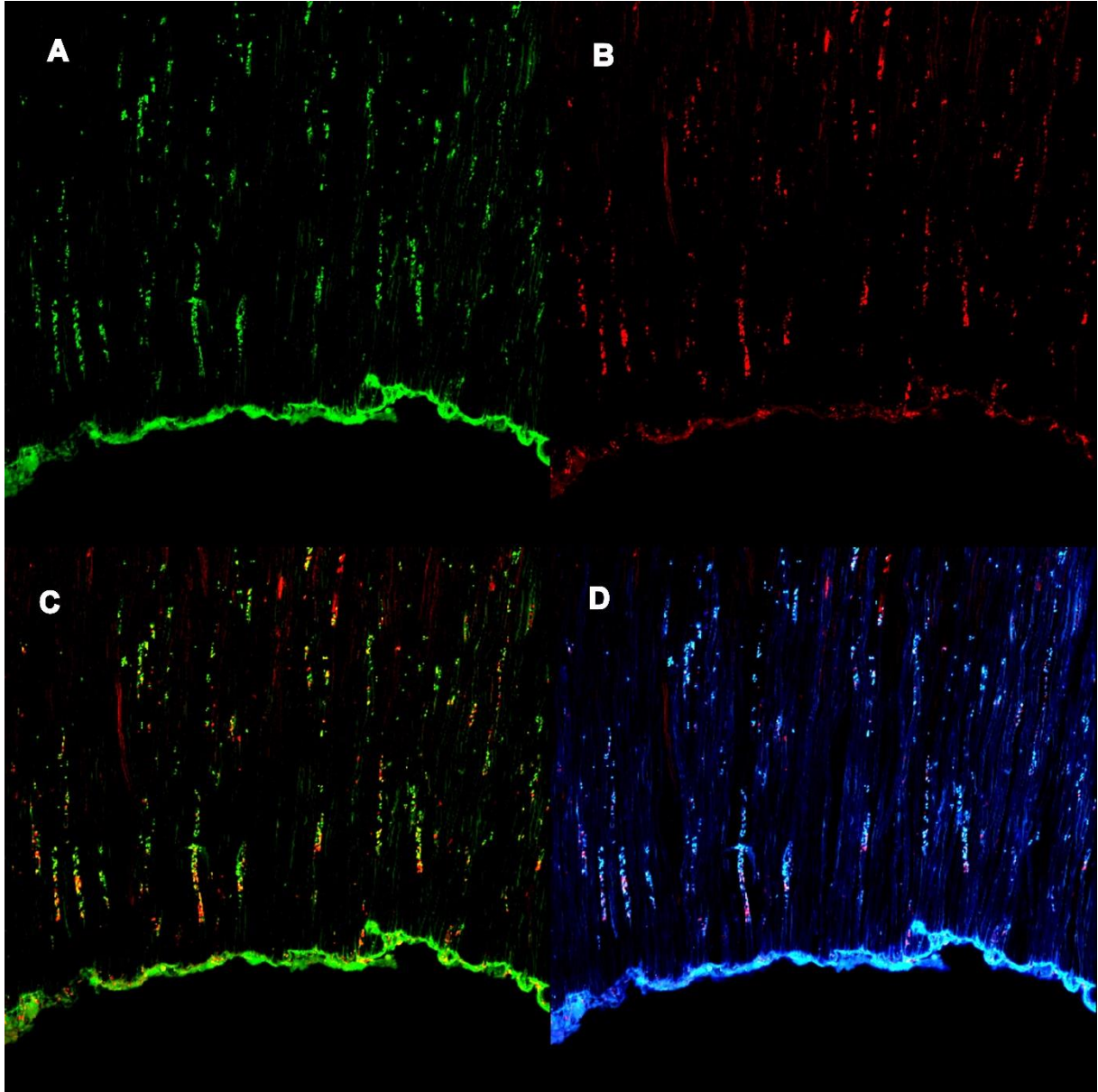


Figura 17: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

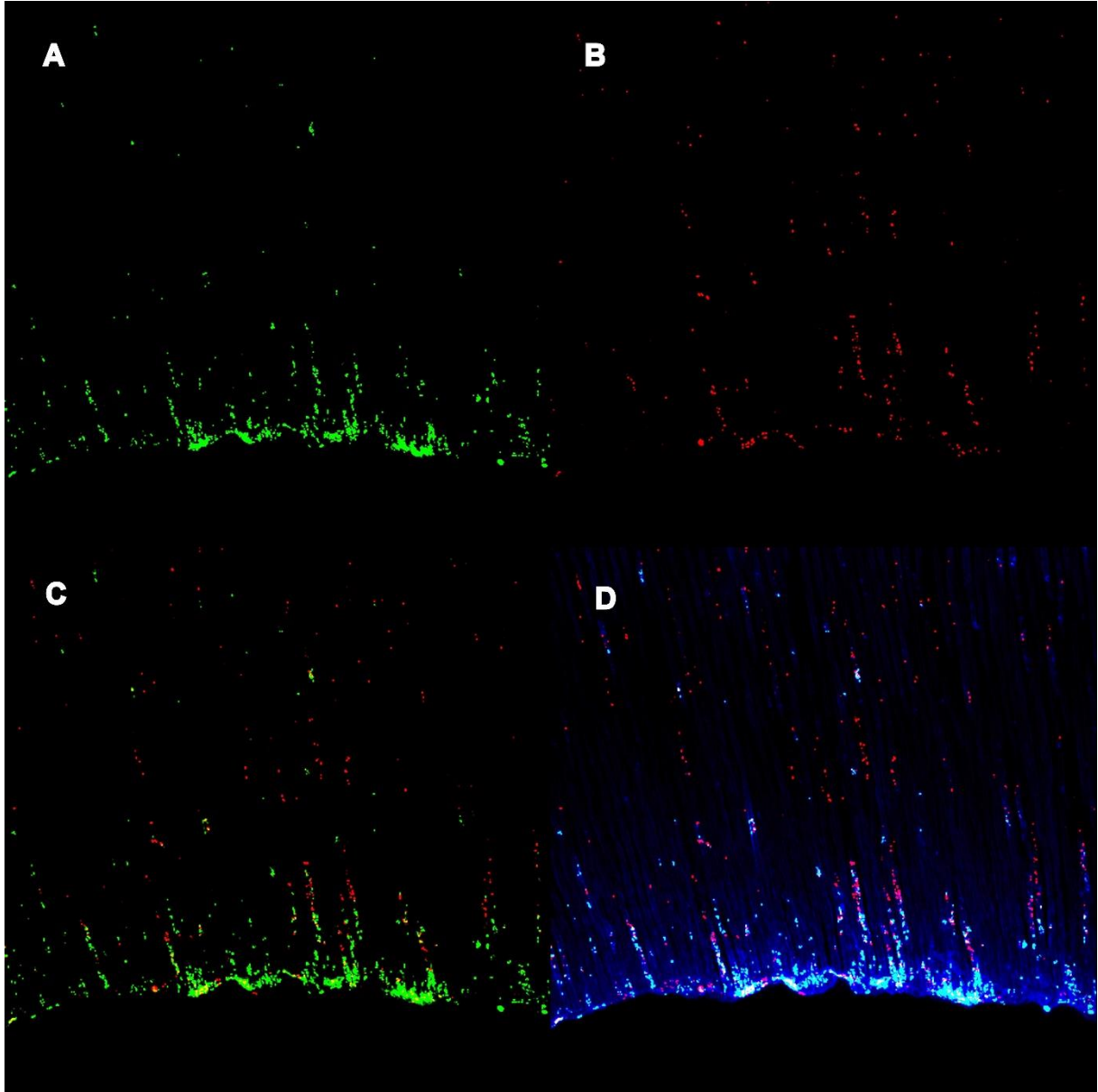




Figura 18: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

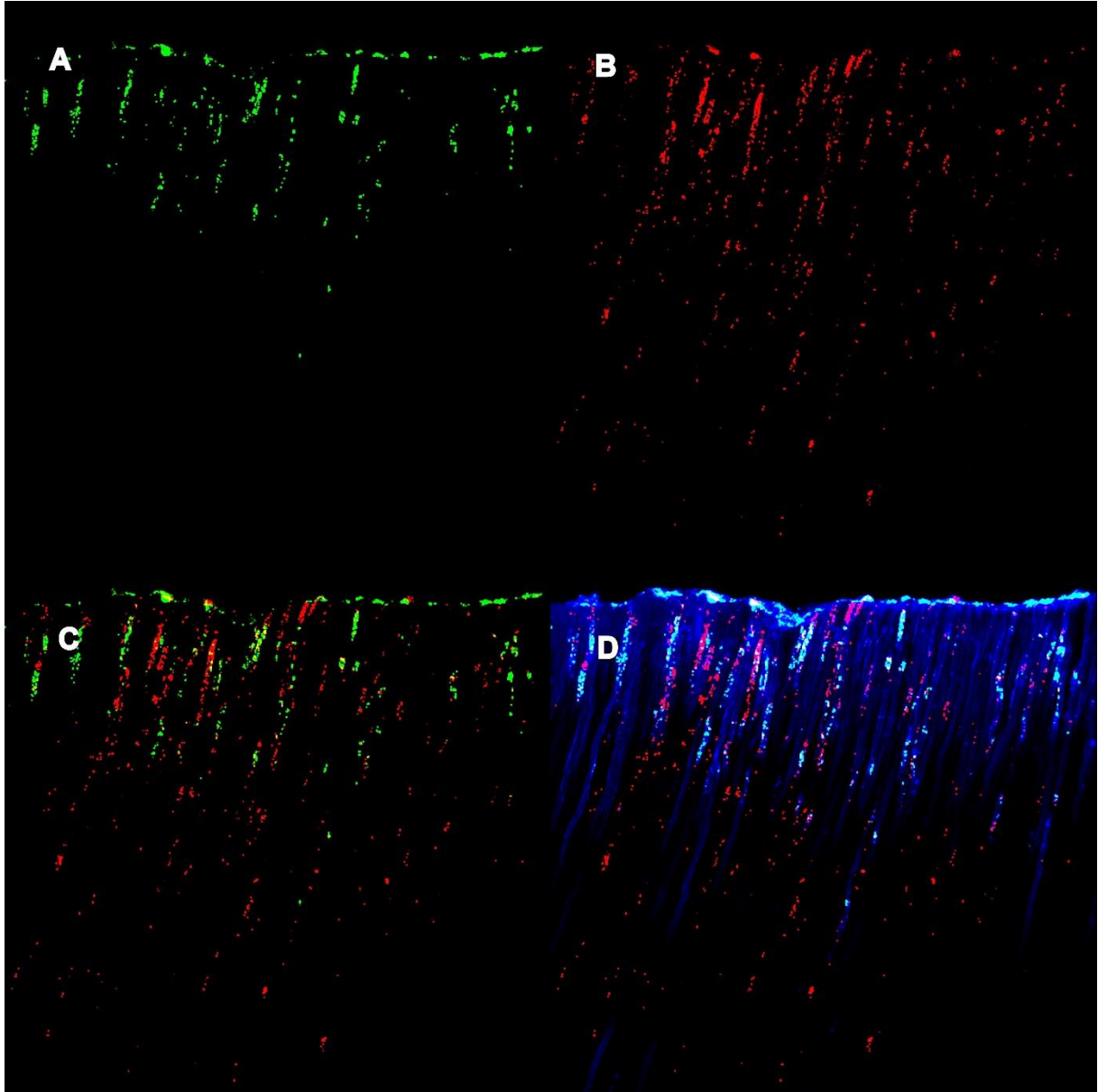




Figura 19: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

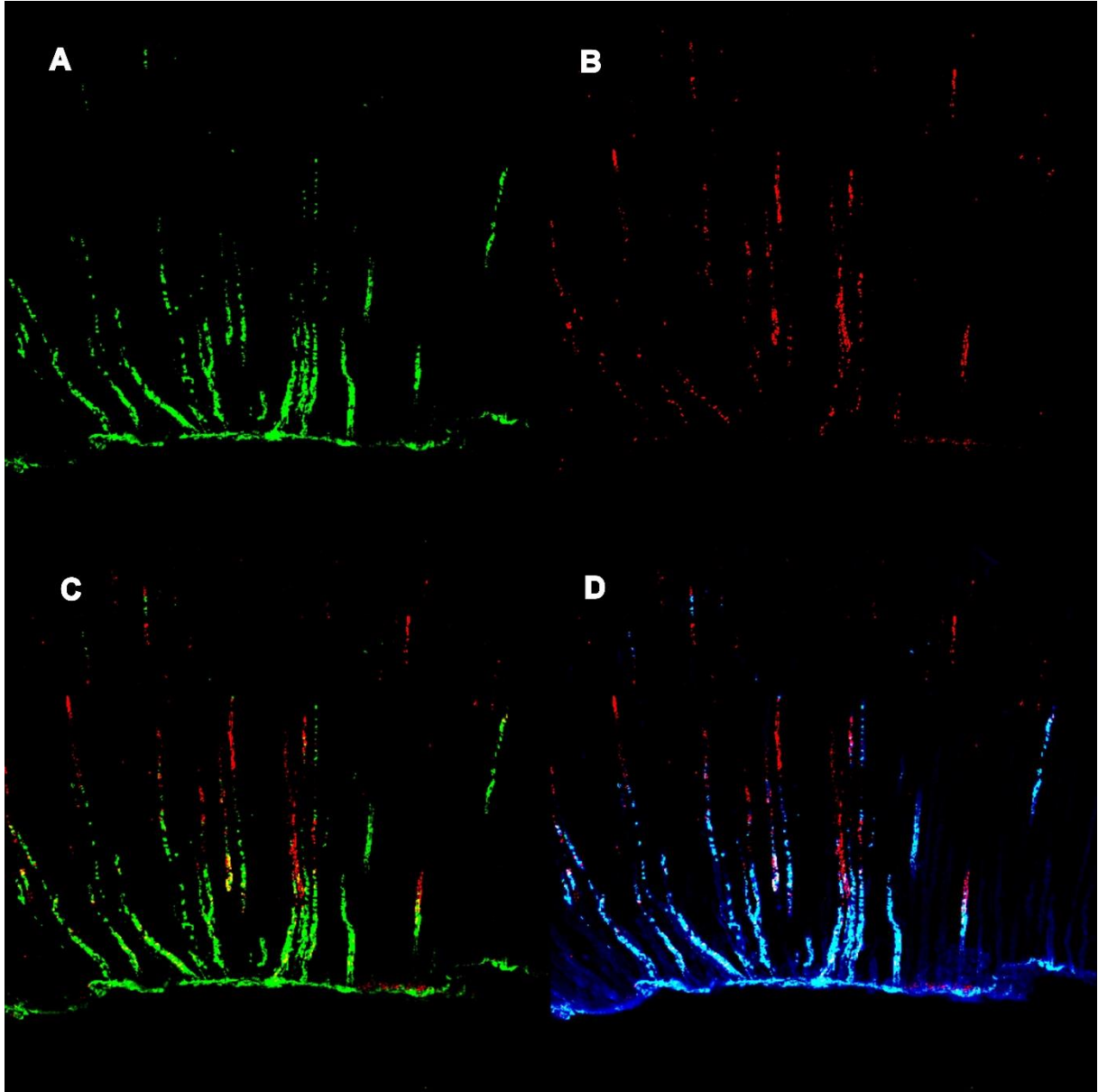


Figura 20: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

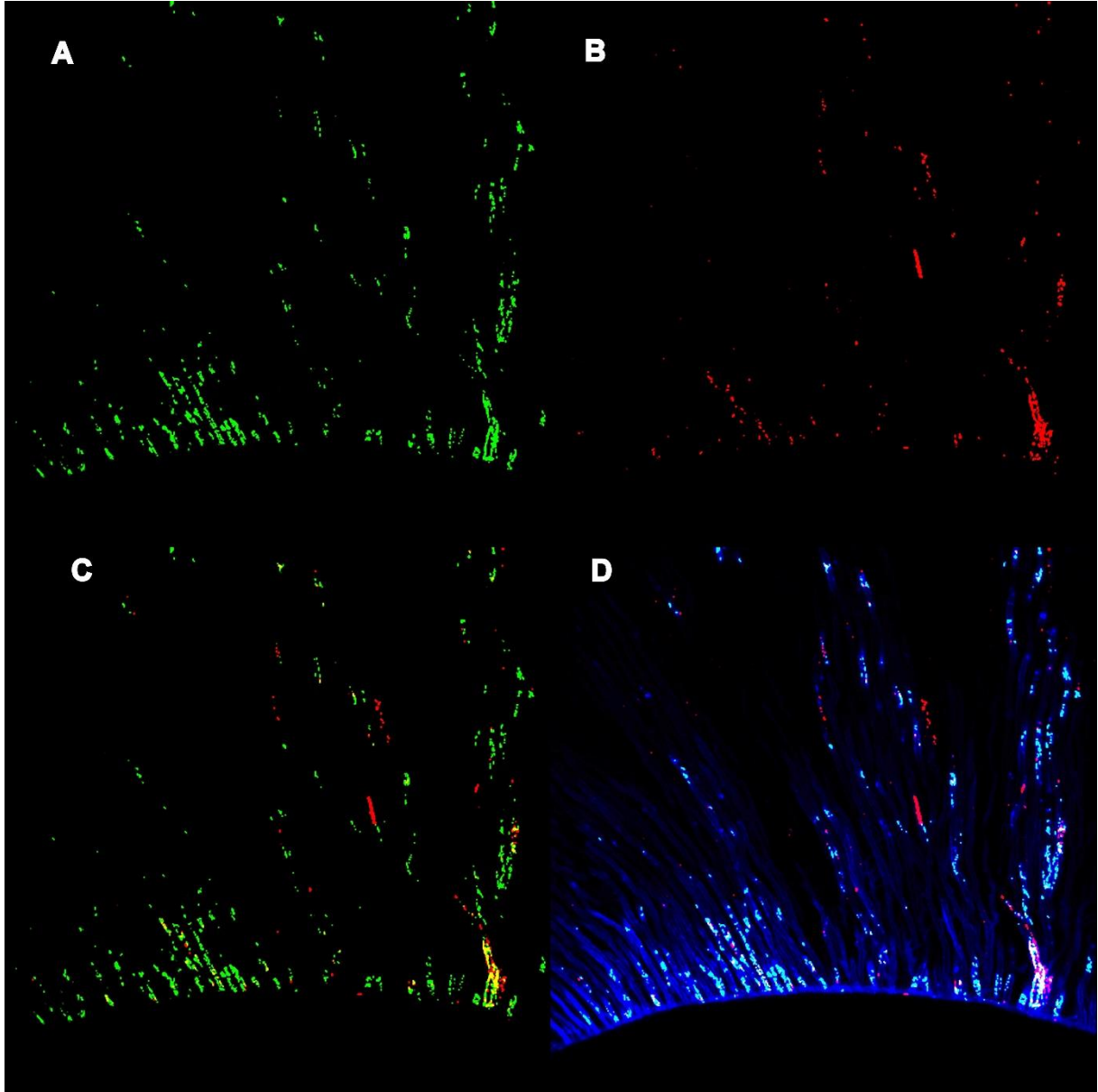


Figura 21: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

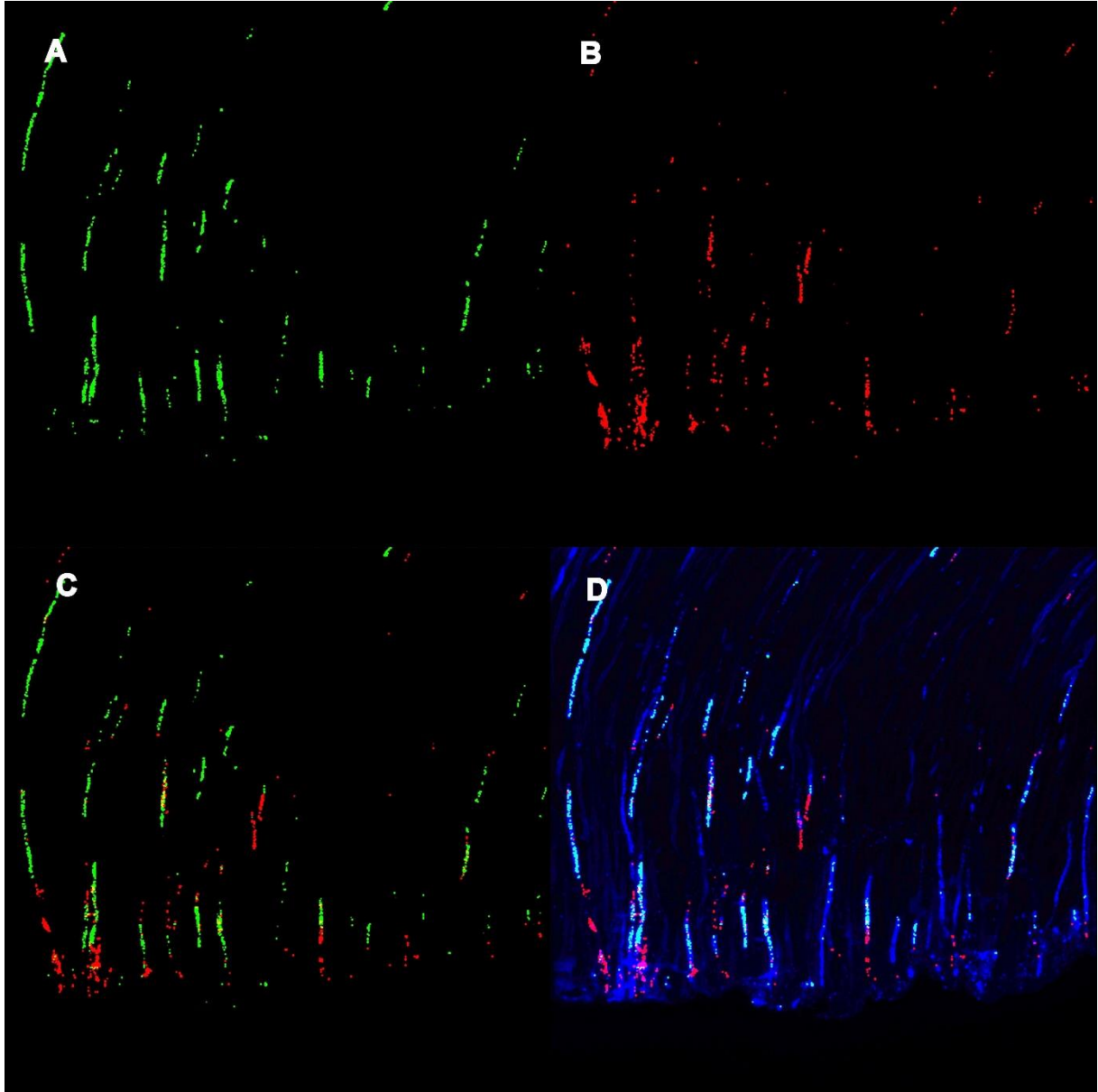


Figura 22: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

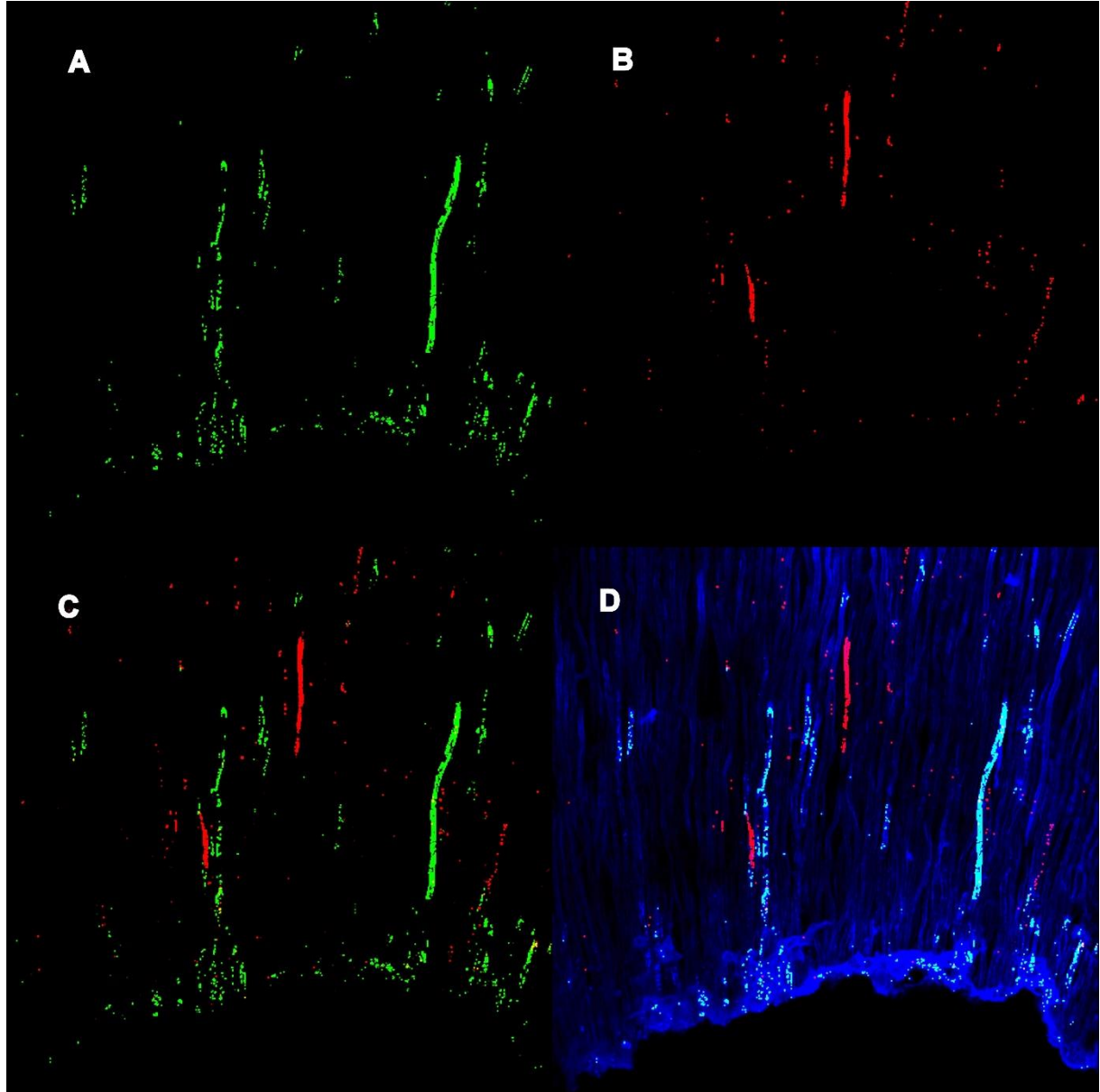


Figura 23: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular. Análise por MCVL após tratamento com *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

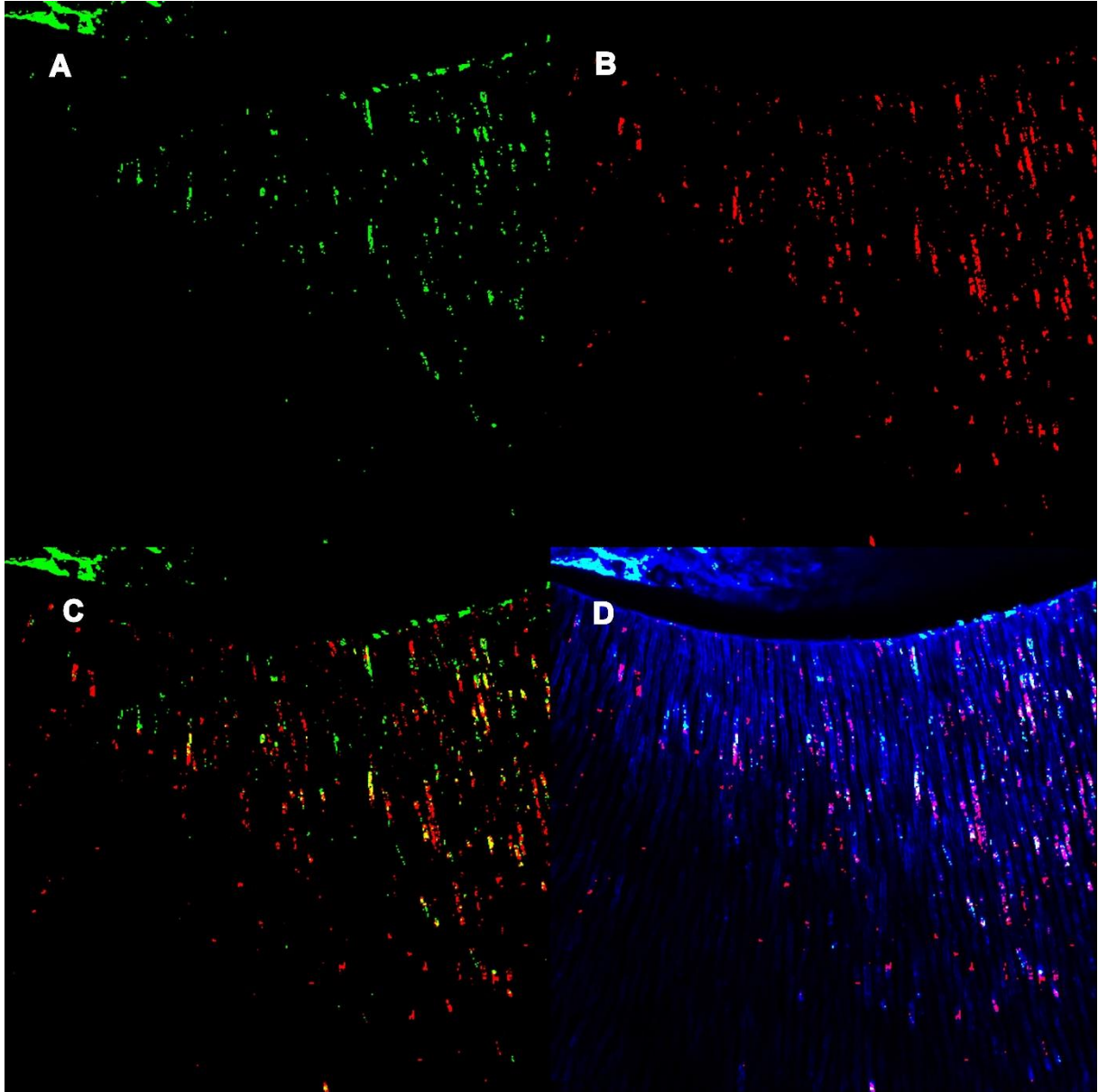




Figura 24: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular em MCVL, após tratamento com hipoclorito de sódio 5,25%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

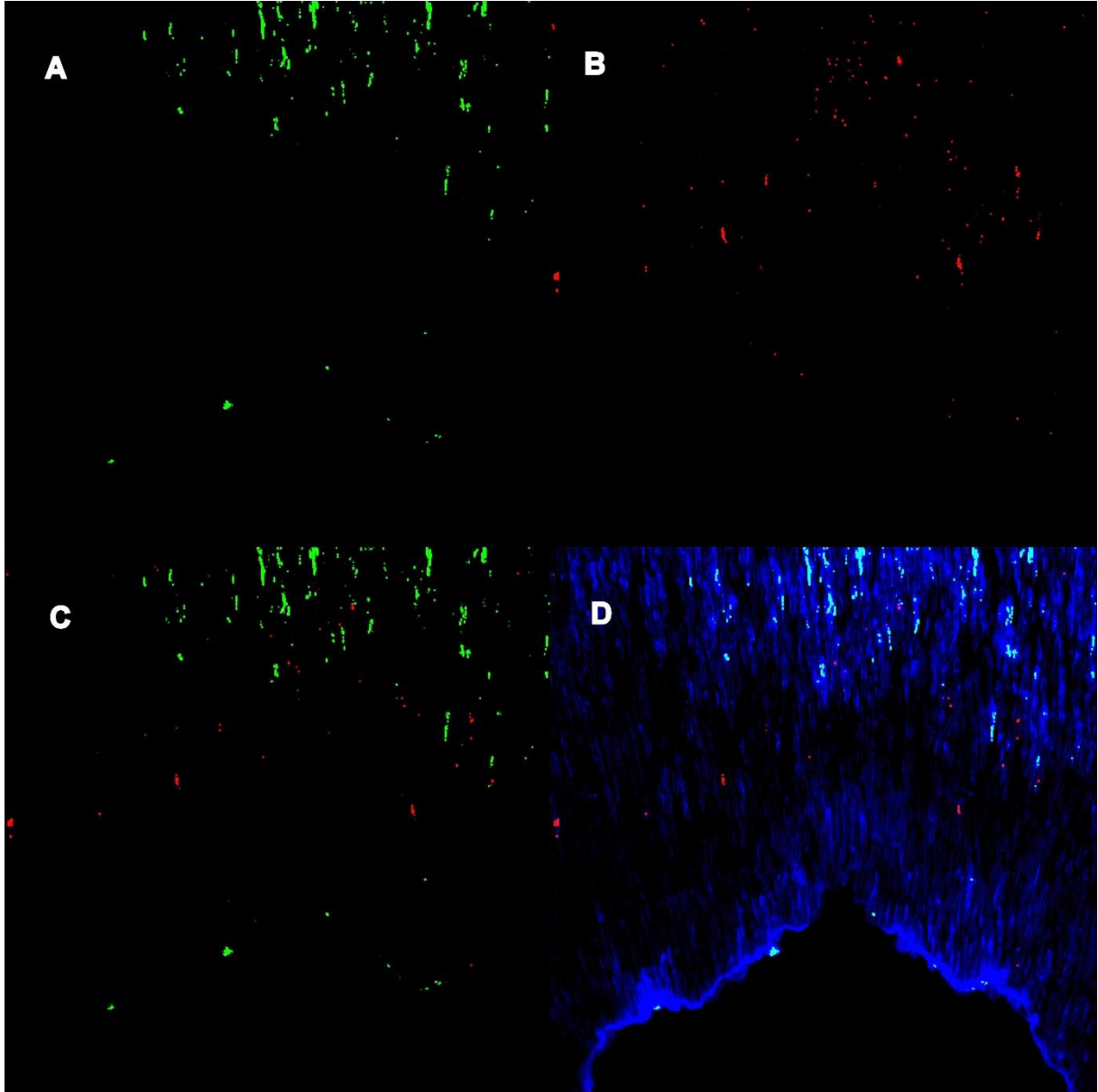


Figura 25: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular em MCVL, após tratamento com hipoclorito de sódio 5,25%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

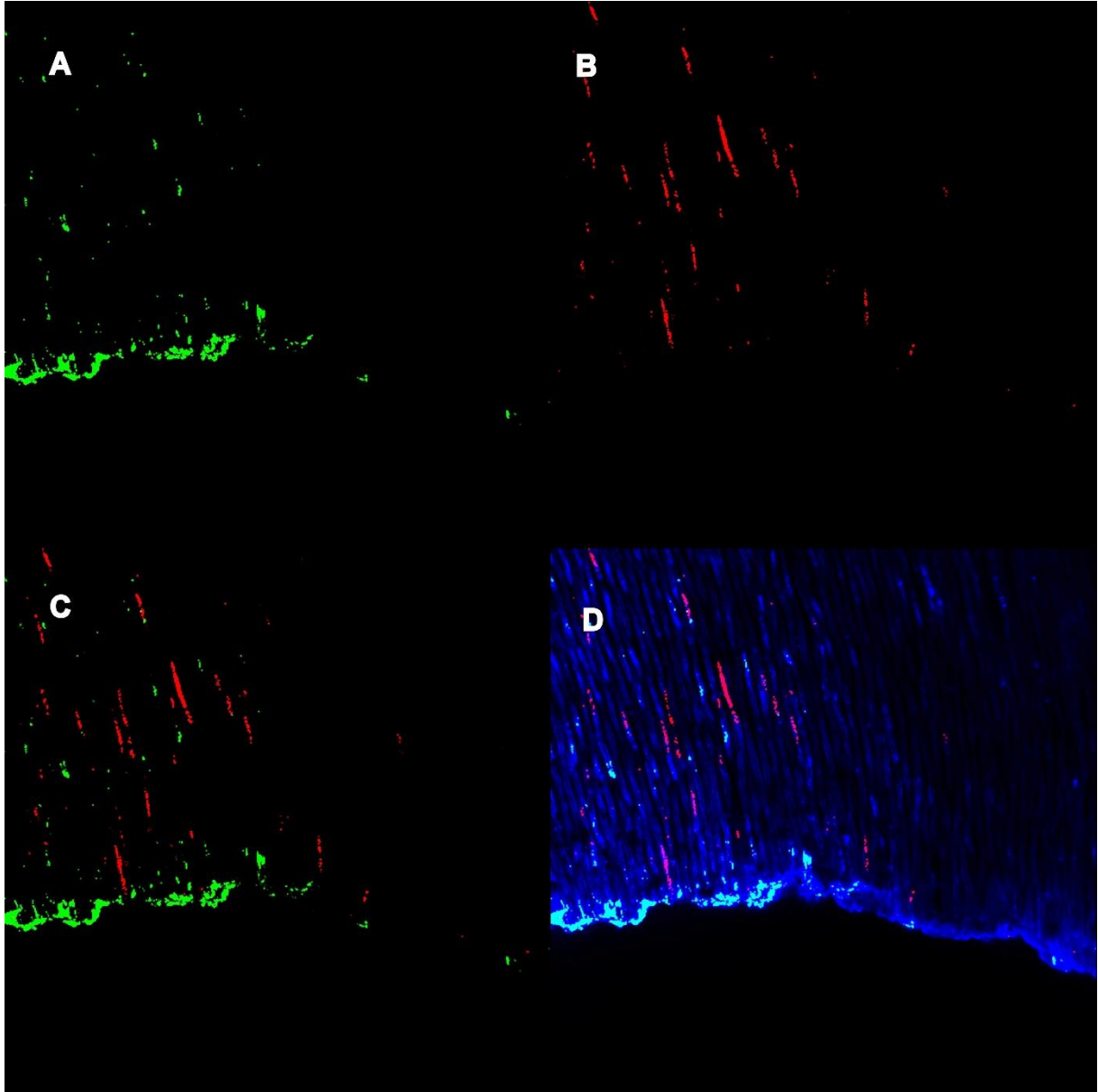


Figura 26: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular em MCVL, após tratamento com hipoclorito de sódio 5,25%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

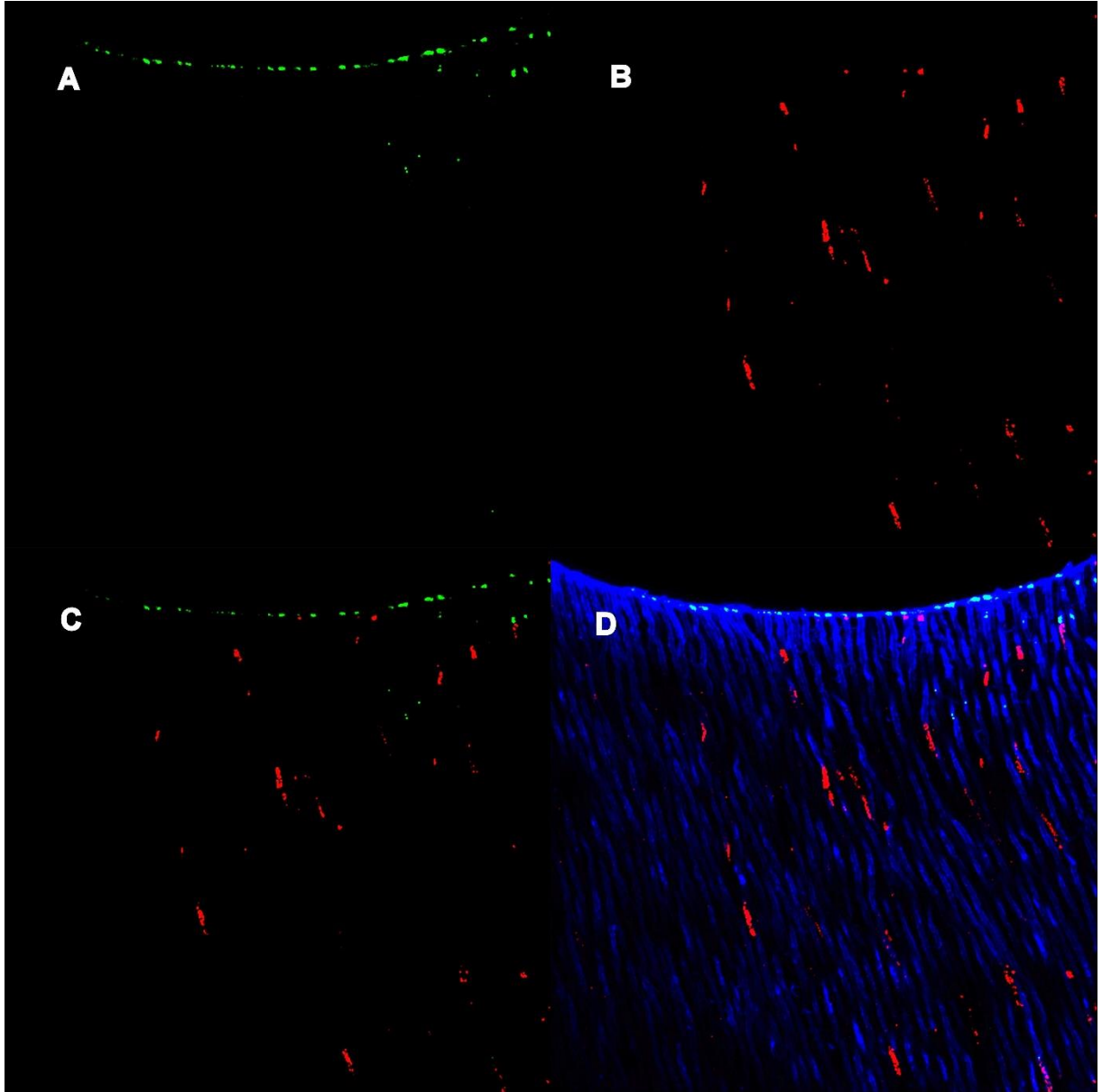




Figura 27: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular em MCVL, após tratamento com clorexidina gel 2%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

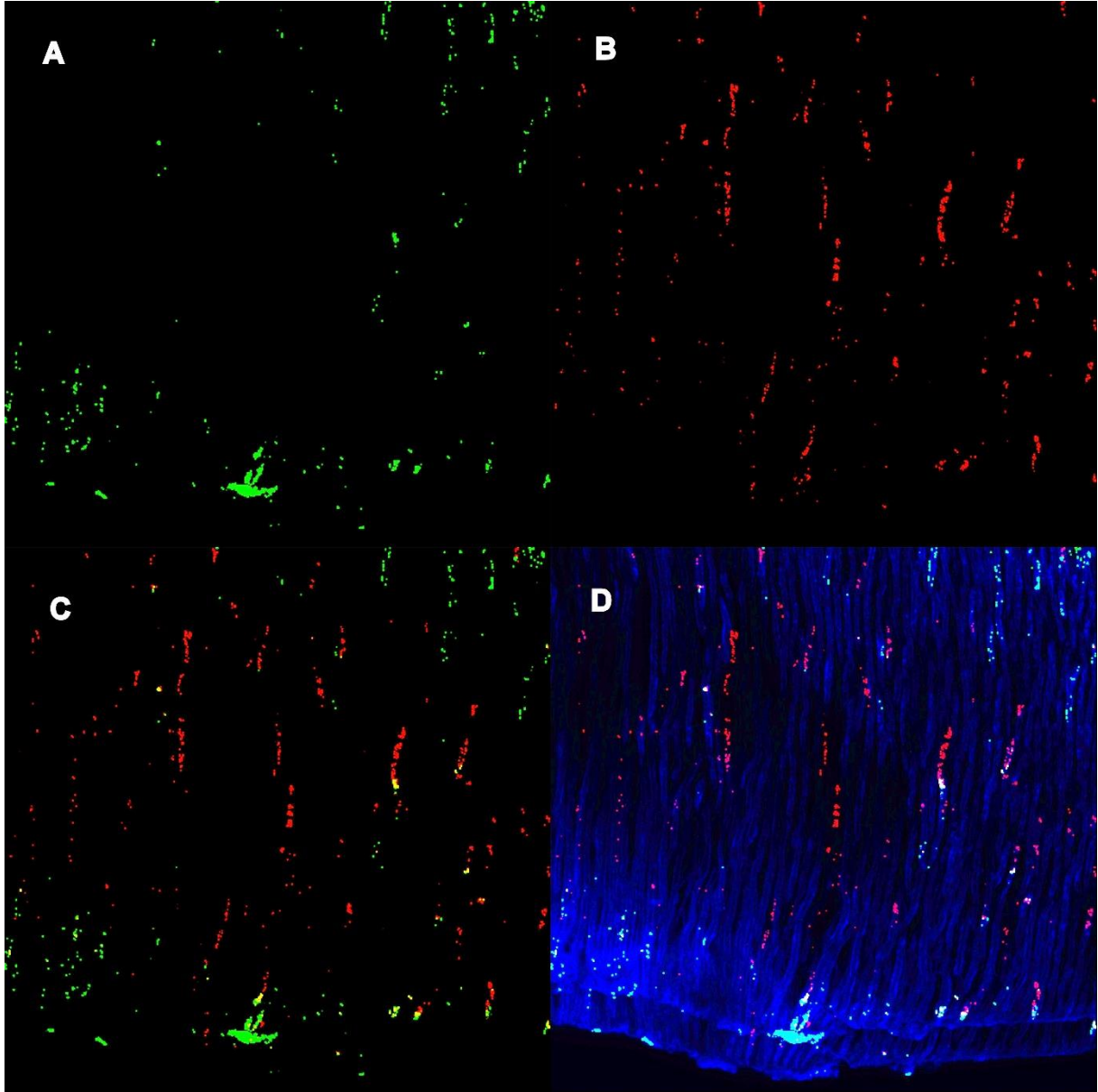


Figura 28: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular em MCVL, após tratamento com clorexidina gel 2%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

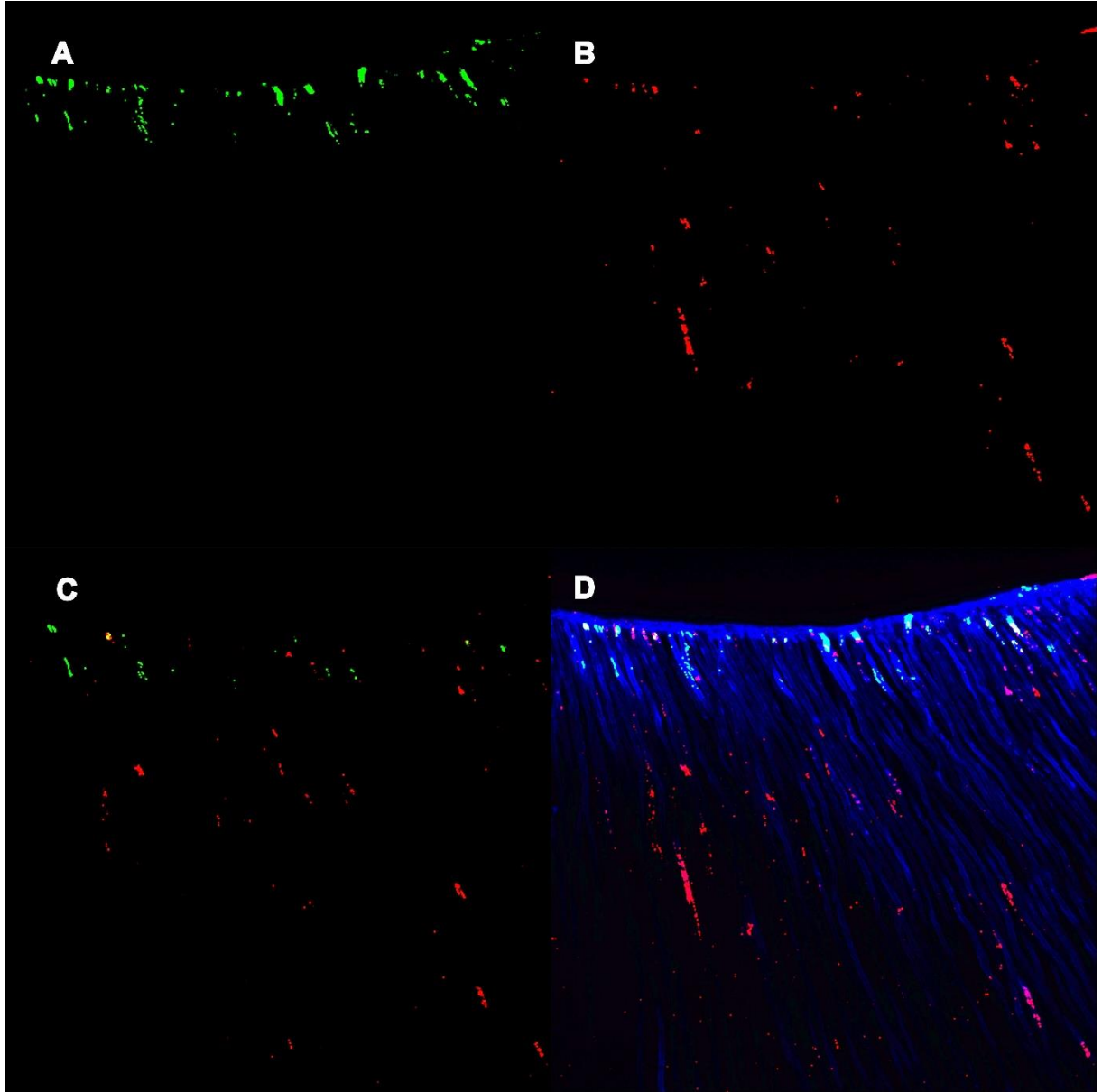


Figura 29: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular em MCVL, após tratamento com clorexidina gel 2%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

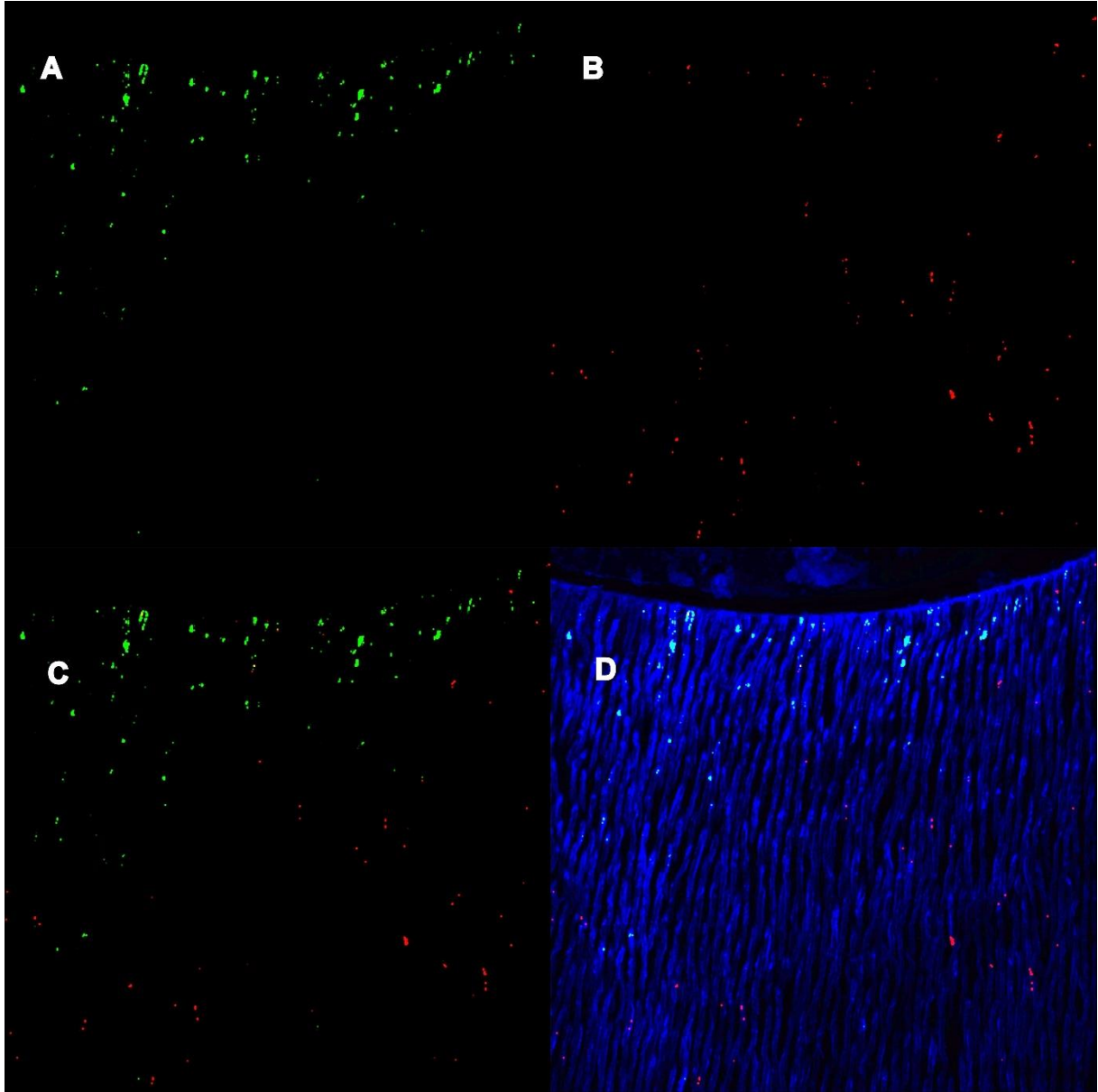


Figura 30: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço cervical da dentina radicular em MCVL, após tratamento com Tween 80 a 0,1%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

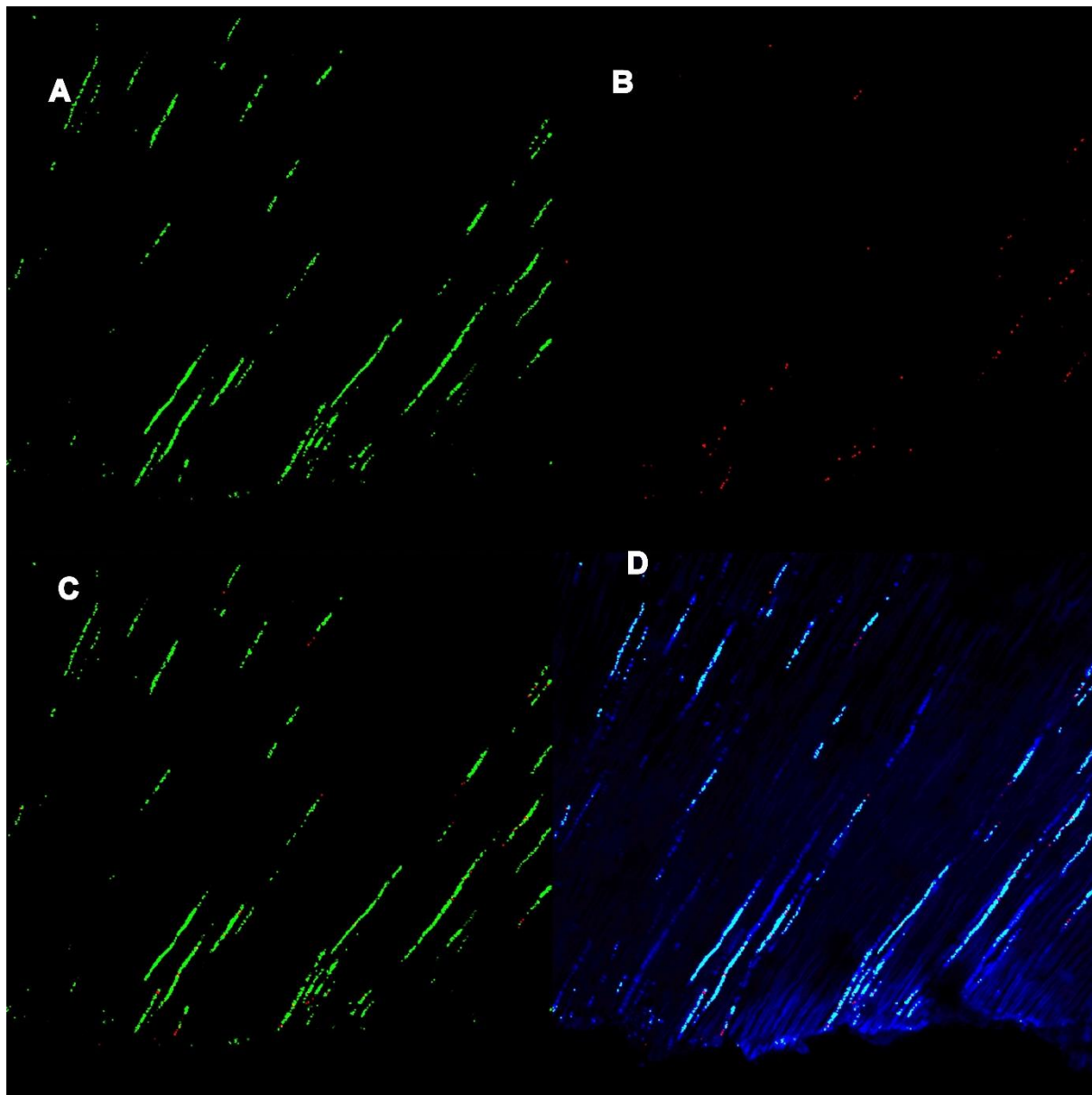


Figura 31: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço médio da dentina radicular em MCVL, após tratamento com Tween 80 a 0,1%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).

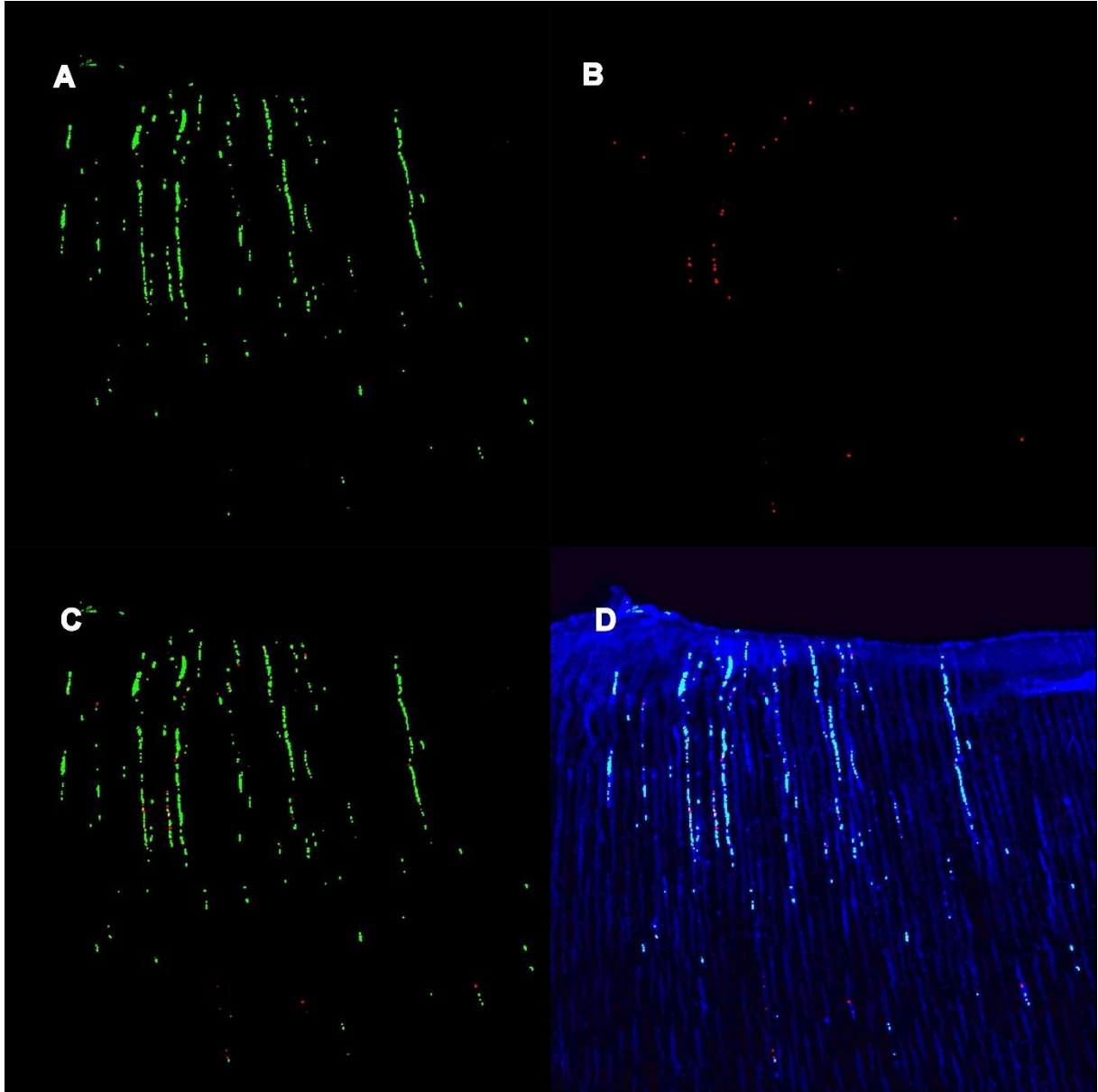
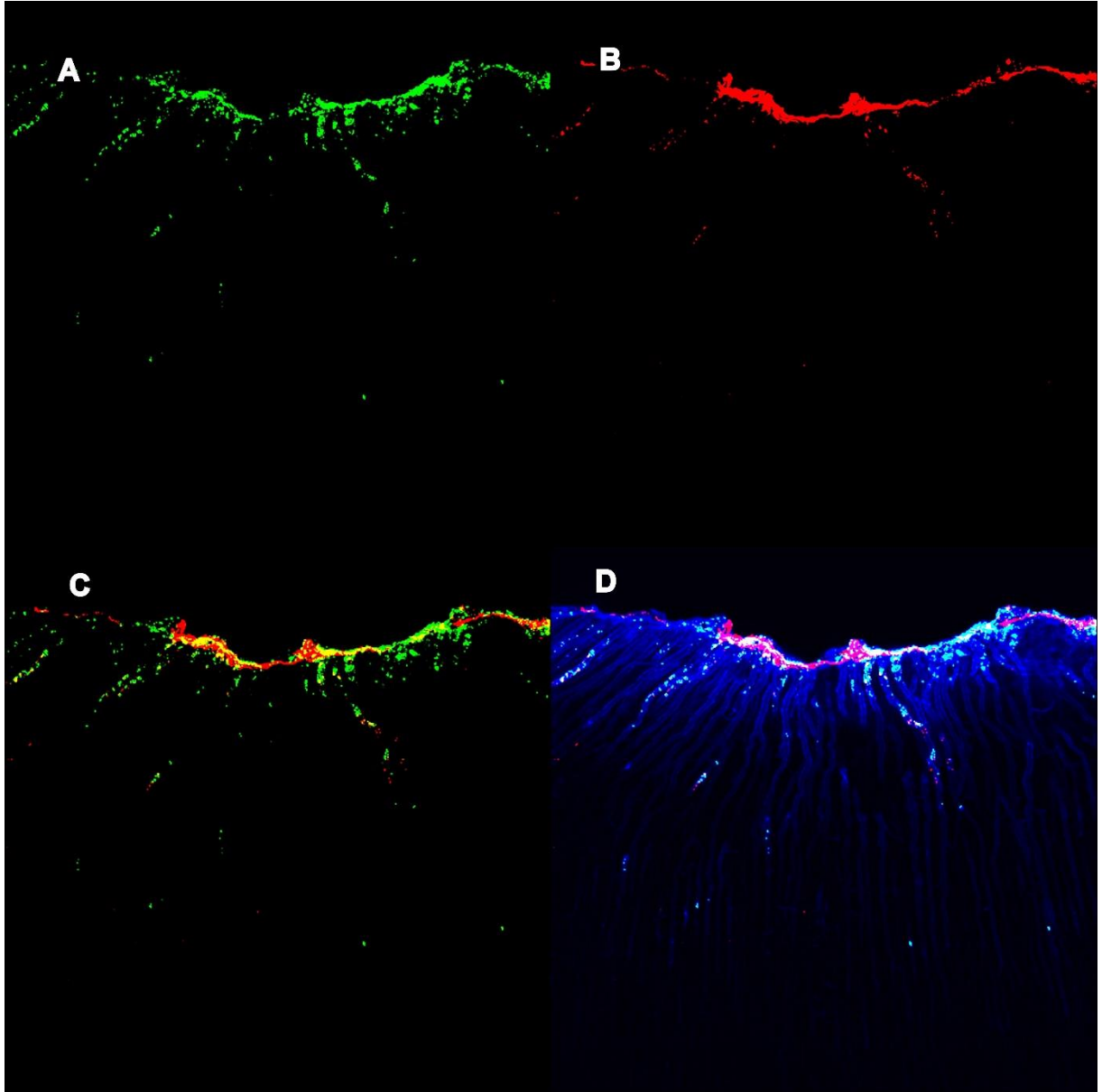


Figura 32: Micro-organismos remanescentes nos túbulos dentinários no terço apical da dentina radicular em MCVL, após tratamento com Tween 80 a 0,1%. A. Coloração das células viáveis em verde. B. Coloração das células não viáveis em vermelho. C. Sobreposição das células viáveis e não viáveis. D. Sobreposição das células viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários (azul).





## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Atividade dos óleos essenciais sobre *E. faecalis* e *C. albicans*

O comprovado potencial antimicrobiano apresentado pelos óleos essenciais, bem como a urgente necessidade de se encontrar novos antimicrobianos em razão da resistência às drogas observada para vários micro-organismos de importância em saúde, tem incentivado estudos sobre a aplicação de produtos naturais em Odontologia. Especificamente na área de endodontia, o hipoclorito de sódio e a clorexidina são amplamente empregados durante o preparo químico endodôntico, embora apresentem algumas desvantagens que limitam suas ações. O hipoclorito de sódio quando utilizado em altas concentrações, ou seja, ao redor de 5% aumenta a citotoxicidade em contato com o tecido periapical podendo causar dor pós-operatória (Dunavant et al., 2006), enquanto a clorexidina não possui ação dissolvente da matéria orgânica (Okino et al., 2004) e tem ação limitada sobre bactérias Gram-negativas. Por essas razões, neste trabalho foram investigados diferentes óleos essenciais obtidos de plantas medicinais e aromáticas nativas e exóticas do Brasil, como alternativas naturais de soluções irrigadoras para o tratamento de canais radiculares de dentes humanos extraídos (*ex vivo*). A ação dos óleos foi avaliada frente à uma cepa padrão e um isolado clínico da bactéria *E. faecalis* e da levedura *C. albicans*, reconhecidos como endopatógenos resistentes à terapia endodôntica.

Dentre um total de 24 óleos essenciais inicialmente selecionados para o estudo, apenas oito foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *E. faecalis* e da levedura *C. albicans* na faixa de concentração estudada, ou seja, até 1 mg/mL, sendo os óleos de *C. martinii*, *L. sidoides* e *T. riparia* os mais ativos frente às cepas padrão e isolados clínicos (Tabela 2). Foi ainda possível comprovar uma resistência maior dos isolados clínicos aos óleos essenciais em relação às cepas padrão, conforme relatado anteriormente por Furletti et al. (2011) para *Candida* spp. Segundo Ferrari et al. (2010), esta maior resistência em relação às cepas de referência pode ser atribuída aos períodos de privação nutricional enfrentados pelas células de isolados clínicos provenientes do canal radicular. Alguns micro-organismos anaeróbios facultativos como *E. faecalis* e a *C. albicans* podem entrar num estado viável, mas não-cultivável

(VBNC), o qual é um mecanismo de sobrevivência adotado quando expostos a um ambiente com condições adversas, incluindo concentrações baixas de nutrientes, alta salinidade e pH extremo, como os envolvidos no tratamento endodôntico (Delgado et al., 2013), sendo capazes de retomar às atividades quando as condições ambientais favoráveis forem restauradas (Signoretto et al., 2000; Portenier et al., 2003; E et al., 2015). Também Chávez de Paz et al. (2003) sugeriram que os procedimentos endodônticos, como preparo do canal e medicação intracanal podem selecionar micro-organismos mais resistentes, por estas manobras serem mais efetivas contra Gram-negativos que Gram-positivos. Desta forma, bactérias facultativas e Gram-positivas mostram-se muito mais resistentes ao preparo do canal radicular e aos agentes antimicrobianos e, portanto, apresentam maiores chances de persistirem após a terapia endodôntica.

Em relação às atividades antimicrobianas conferidas pelos óleos essenciais sobre *E. faecalis* e *C. albicans*, Duarte et al. (2005, 2007) classificaram extratos e óleos essenciais como sendo de “elevada inibição”, aqueles de CIM até 0,5 mg/mL; “moderada inibição”, de CIM entre 0,6 e 1,0 mg/mL e de “baixa inibição”, de CIM acima de 1 mg/mL. Deste modo, considerando os valores de CIM encontrados neste trabalho, os óleos essenciais que demonstraram elevada inibição contra todas as cepas dos micro-organismos foram o de *T. riparia* para *E. faecalis* (0,3 mg/mL) e os de *C. martinii* e *L. sidoides* para *C. albicans* (0,2 mg/mL a 0,35 mg/mL). Assim, com base nos dados de CIM/ CBM/ CFM foi possível constatar que o melhor resultado foi alcançado com o óleo essencial de *T. riparia* sobre as cepas de *E. faecalis*. No entanto, este óleo não apresentou atividade frente à *C. albicans* na faixa de concentração avaliada, em contraste aos óleos essenciais de *C. martinii* e *L. sidoides*, que foram ativos contra as cepas da levedura (Tabela 2).

Outros autores avaliaram a ação do óleo essencial de *C. martinii* frente a *C. albicans*, observando valores de CIM entre 0,06 e 0,25 mg/mL (Furletti et al., 2011) e 0,56 mg/mL (Cavalcanti et al., 2011). Bersan et al. (2014) verificaram que o óleo de *C. martinii* apresentou CIM/CBM de 0,015/0,125 mg/mL, enquanto para *L. sidoides* e *C. sativum* estes foram de 0,250/0,500 mg/mL e 0,007/0,015 mg/mL, respectivamente. Por outro lado, baixa atividade antifúngica para os óleos de *C. martinii* frente a *C. albicans* (CIM > 2 mg/mL) foi também relatada anteriormente (Sartoratto et al., 2004;



Duarte et al., 2005), provavelmente por diferenças de resistência entre a cepa padrão estudada nesses trabalhos em relação as do presente estudo.

Cavalcanti et al. (2011) foram os únicos autores a pesquisar a atividade antibacteriana do óleo de *C. martinii* frente ao *E. faecalis*, relatando CIM de 0,56 mg/mL, o que pode ser considerada como elevada ação inibitória frente a esta bactéria. Em contraste, na presente pesquisa este óleo apresentou ação moderada contra o *E. faecalis* ATCC (0,7 mg/mL). No entanto, a determinação da CIM no estudo de Cavalcanti et al. (2011) foi determinada subjetivamente, somente pela observação da turvação do meio de cultura.

Em relação às pesquisas envolvendo a ação antimicrobiana do óleo essencial de *T. riparia*, somente Gazim et al. (2010) investigaram sua ação frente a *E. faecalis*, obtendo valores entre 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, e frente a *C. albicans* entre 31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL. Ainda, os autores relataram os menores valores de CIM para o óleo obtido no verão.

A análise de CIM para as blendas 1, 2 e 4 de *C. martinii* e *T. riparia* mostrou que estas conferiram forte inibição do crescimento de células planctônicas, tanto de *E. faecalis* quanto de *C. albicans* (Tabela 4). A blenda 3, por sua vez, apresentou inibição moderada frente ao *E. faecalis* e elevada frente a *C. albicans*. Quanto à análise dos valores de CBM e CFM, verificou-se os menores valores para a blenda 4 frente aos dois micro-organismos, tanto para a cepa padrão quanto para o IC (Tabela 4). Desse modo, considerando os valores de CIM e CBM/CFM dos três óleos essenciais mais ativos foi determinado o modo de ação dos óleos, com base no preconizado pelo CLSI (2009). Assim, quando a razão CBM:CIM ou CFM:CIM situa-se entre 1:1 e 2:1, o óleo essencial pode ser considerado bactericida/fungicida e quando a proporção for maior do que 2:1, bacteriostático/fungistático. Aplicando este princípio aos resultados obtidos para os óleos de *C. martinii*, *L. sidoides* e *T. riparia* pode-se inferir que estes tiveram ações bactericidas e fungicidas sobre os micro-organismos avaliados.

A maioria dos estudos tem focado em micro-organismos no estado planctônico para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* (Aligiannis et al., 2001; Hammer et al., 2003; Sartoratto et al., 2004; Takarada et al., 2004; Botelho et al., 2007; Duarte et al., 2005, 2007; Cha et al., 2007; Valgas et al., 2007; Mayaud et al., 2008; Maggi et al., 2009; Gazim et al., 2010; Cavalcanti et al., 2011; Thosar et al., 2013;

Abbaszadegan et al., 2015; Melo et al., 2015, Pereira et al., 2016). No entanto, considerando que micro-organismos são capazes de crescer em estruturas de biofilme e que estes apresentam uma maior resistência às drogas, torna-se importante avaliar os mecanismos de formação de biofilmes sob a ação dos produtos naturais. Assim sendo, pelos resultados da ação inibitória dos óleos essenciais mais ativos sobre a formação do biofilme pelos micro-organismos (Figuras 1 a 4) foi possível verificar que, para as cepas de *E. faecalis* as blendas apresentaram uma maior ação inibitória mesmo em concentrações mais baixas, do que quando os óleos essenciais foram aplicados isoladamente (Figuras 1 e 2), destacando-se a blenda 4, composta pelos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia*. O mesmo perfil de inibição foi observado para *C. albicans*, se compararmos a ação dos óleos essenciais com a das blendas (Figuras 3 e 4).

## 6.2 Composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais podem apresentar variabilidade em qualidade, quantidade e composição química de acordo com o clima, órgão da planta coletado, constituição do solo, época da colheita, idade e o ciclo vegetativo da planta e o método de extração do óleo essencial. A composição complexa dos óleos essenciais abrange uma mistura entre 20 a 80 constituintes, em que dois a três compostos estão presentes em maior proporção (20 a 70 %), seguido dos compostos traços, denominados minoritários (Bakkali et al., 2008), os quais podem exercer importante papel sobre a atividade antimicrobiana, como efeitos aditivos, indiferentes, antagonistas e sinérgicos.

Em estudo desenvolvido por Araújo (2014), o maior rendimento de óleo essencial *T. riparia* foi verificado para plantas cultivadas nos tratamentos de 30% e 50% de sombreamento do que a pleno sol, sendo os valores de rendimento 0,26% e 0,23% respectivamente. Este mesmo autor relata que a composição química também pode sofrer variações devido ao nível de sombreamento das plantas. O componente majoritário do óleo essencial de *T. riparia* também foi o hidrocarboneto sesquiterpênico 14-hidróxi-9-epi-(E)- cariofileno, com 16,03%, 16,48%, 16,41%,

16,42% para as plantas cultivadas nos tratamentos a pleno sol, com 30%, 50% e 80% de sombreamento, respectivamente.

A caracterização química dos óleos da blenda 4 por CG-EM revelou que o óleo essencial de *C. martinii* apresentava como constituinte majoritário o trans-geraniol, que correspondeu a 85,39% de sua composição (Tabela 5), corroborando com os resultados de Duarte et al. (2005, 2007) e Mayaud et al. (2008), que encontraram este composto como predominante neste óleo, com valores de 63,46% e 77,98%, respectivamente. Segundo Scherer et al. (2009), o geraniol encontrado no óleo de palmarosa tem sido relatado como um composto de elevada atividade antimicrobiana.

Quanto ao óleo essencial de *T. riparia*, houve predominância dos sesquiterpenos oxigenados em 50,88 %, sendo os compostos 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno (21,02%) e um composto de massa molar M= 222, (29,86%) (Tabela 6). Gazim et al. (2010) também encontraram a predominância do composto 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno (24,36%) no óleo essencial de *T. riparia*, extraído durante o verão. Esta maior atividade, observada contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *C. albicans* para o óleo obtido no verão foi atribuída à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, que segundo Mothana et al. (2010) é mais efetiva frente a micro-organismos Gram-positivos. Do mesmo modo, Melo et al. (2015) identificaram 37 compostos químicos no óleo essencial da *T. riparia*, com predominância de sesquiterpenos oxigenados (42,7%).

### **6.3 Citotoxicidade *in vitro* dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* (blenda 4)**

Com as mudanças de paradigmas ocorridas na endodontia recentemente no que diz respeito a patência e limpeza do forame apical, há uma tendência de rediscussão do papel das substâncias químicas auxiliares. Neste ponto de vista, o tratamento endodôntico deve proporcionar, além da limpeza e desinfecção por meio da instrumentação e irrigação do sistema de canais radiculares, segurança durante sua execução, a fim de prevenir danos aos tecidos periapicais (Bourreau et al., 2015).

O ideal é que as substâncias irrigadoras sejam atóxicas, dado o risco de extravasamento da solução através do forame apical ser maior quando utilizada a técnica de ampliação foraminal. Neste sentido, os óleos essenciais estudados contemplam esta necessidade, pois o *T. riparia* não interferiu no crescimento da linhagem de queratinócitos humanos, conferindo ausência de citotoxicidade *in vitro* e o *C. martinii* apresentou moderada citotoxicidade sobre células humanas.

Apesar deste resultado, estudos adicionais a respeito da citotoxicidade são necessários, buscando avaliar a ação destes óleos essenciais frente às células com maiores semelhanças às encontradas no periápice dentário.

#### **6.4 Ação antimicrobiana dos óleos essenciais como soluções irrigadoras *ex vivo***

Conforme explicado anteriormente, a seleção das concentrações finais das blendas de *C. martinii* e *T. riparia* foi baseada no valor mais ativo de CIM e CBM/CFM obtido para esta blenda, contra todas as cepas microbianas testadas, ou seja, 0,5 mg/mL. A partir disso, a próxima concentração selecionada foi 5 vezes e 10 vezes este valor. Portanto, as soluções irrigadoras compostas pelos óleos essenciais mais ativos, utilizadas nos ensaios *ex vivo* foram: 1. Blenda dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* 0,5 mg/mL; 2. Blenda dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* 2,5 mg/mL e 3. Blenda dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL. Lembrando que todas as soluções foram preparadas em solução de Tween 80 0,1%.

Para a execução dos ensaios *ex vivo*, a concentração selecionada para o hipoclorito de sódio foi 5,25%, tendo como objetivo elevar a efetividade antimicrobiana e o potencial de dissolução em áreas inacessíveis ao instrumento endodôntico, como os túbulos dentinários (Abou-Rass e Oglesby, 1981). Porém, existe a preocupação em relação às altas concentrações, já que aumentam a citotoxicidade em contato com o tecido periapical (Dunavant et al., 2006).

Em relação à redução das UFC do *E. faecalis* após o PQM com as diferentes soluções irrigadoras associadas à instrumentação reciprocante, observou-se os melhores resultados com a clorexidina gel 2% (100%), sendo diferente

estatisticamente do grupo controle negativo. A blenda de *C. martinii* e *T. riparia* na concentração 5,0 mg/mL (97,16%) apresentou resultado semelhante aos controles positivos, porém não foi diferente estatisticamente do grupo controle negativo (Tween 80 a 0,1% - 95,96%) – Tabela 10. Quando analisada estatisticamente, a redução do número de UFC/mL de *C. albicans* no canal radicular principal foi mais efetiva com hipoclorito de sódio 5,25% (100%) e clorexidina gel 2% (100%), sendo estatisticamente superiores ao controle negativo (97,60%) e semelhantes às blendas de óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* em todas concentrações.

Assim, de acordo com os resultados, houve uma redução na contaminação dos canais radiculares em todos os grupos, inclusive no controle negativo. No canal radicular principal, a blenda dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* na concentração de 5,0 mg/mL foi tão efetiva quanto o hipoclorito de sódio e a clorexidina na redução de *E. faecalis*. Porém, não houve diferença significativa entre as blendas, o hipoclorito de sódio e a substância controle negativo, provavelmente devido à ação dos instrumentos endodônticos utilizados em conjunto com as soluções irrigadoras já promover uma redução expressiva no conteúdo microbiano do canal radicular, propiciando a remoção mecânica do biofilme das paredes do canal. O mesmo foi observado em relação à levedura *C. albicans*, onde todas as concentrações testadas para a blenda de óleos essenciais foram efetivas, sendo semelhante ao hipoclorito de sódio e à clorexidina, no entanto sem apresentar diferença significativa em relação ao controle negativo.

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, de composição química complexa e insolúveis em água. Desta forma, para a realização tanto da análise antimicrobiana *in vitro* como *ex vivo*, houve a necessidade de diluição destas amostras em agentes emulsificadores, como DMSO, Tween 20 ou Tween 80. Tomou-se o cuidado de se utilizar a mínima quantidade necessária para solubilização dos óleos essenciais, pois esta deve ser controlada, de modo a evitar interferência na atividade do óleo, tanto por aumentar sua ação antimicrobiana produzindo resultados falso-positivos ou por reduzir a bioatividade do óleo, devido a formação de micelas que dificultariam o contato direto do óleo com os micro-organismos (Nascimento et al., 2007).

Outra característica físico-química que desempenha um importante papel na penetração de uma solução desinfetante nos túbulos dentinários é a molhabilidade,

e está diretamente relacionada com a tensão superficial da mesma. Isto torna possível a ampliação da área de ação tanto da capacidade de dissolução de material orgânico como da função antimicrobiana (Wang et al., 2012), por facilitar a penetração da solução em áreas não instrumentadas do sistema de canais radiculares (Taşman et al., 2000), desestabilizando as forças coesivas e facilitando a destruição da matriz polimérica extracelular e membranas bacterianas (Wang et al., 2012; Arias-Moliz et al., 2014). O trabalho de Giardino et al. (2015) comprova esta propriedade, pois relata a melhor ação antimicrobiana de soluções com baixa tensão superficial contra o *E. faecalis*.

Neste contexto, os resultados de tensão superficial obtidos para as soluções irrigadoras utilizadas mostraram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ), onde os menores valores foram apresentados pelo óleo essencial de *C. martinii*, seguido pelo de *T. riparia* (Tabela 7). Adicionalmente, os óleos essenciais apresentaram menor tensão superficial que a solução tensoativa de Tween 80 0,1%, o que pressupõe que esta propriedade seja inerente de cada óleo, sem a interferência do seu diluente para este resultado. Tanto para a tensão superficial como para a densidade, o hipoclorito de sódio apresentou valores muito altos, sendo inferior somente ao soro fisiológico.

Segundo Arias-Moliz et al. (2014), o NaOCl apresenta menor atividade antimicrobiana no interior dos túbulos dentinários do que sobre biofilme aderido em substrato, mesmo após um tempo de contato prolongado, fato também relatado por Du et al. (2014). Isto poderia ser explicado pelo efeito inibidor da dentina sobre a atividade bactericida de NaOCl (Haapasalo et al., 2007), o que pode diminuir a quantidade de cloro livre disponível, ou pela reduzida capacidade da solução irrigante para difundir nas camadas profundas da dentina devido sua alta tensão superficial.

Em relação à clorexidina, esta pode ser aplicada em endodontia tanto na forma líquida quanto gel. Na forma de gel, quando o veículo for o natrosol à base de hidroxietilcelulose, esta torna-se hidrossolúvel e de fácil remoção do interior dos canais. No estado físico de gel pode impedir a formação da *smear layer* durante a instrumentação, devido às características reológicas desta formulação quando aplicadas em conjunto com instrumentos rotatórios, onde se verifica que os resíduos ficam incorporados à massa gelificada, impedindo que estes se acumulem no interior e nas paredes do canal radicular. Semissólidos, tais como os géis, costumam ter o

comportamento tixotrópico do tipo pseudoplástico que se caracteriza devido a tensão de cisalhamento inicial ser maior que a necessária para manter o fluxo, que produz uma queda na viscosidade. Para que o processo de limpeza do sistema de canais radiculares com uma substância semissólida seja efetivo, são necessárias trocas constantes da substância com sua remoção por meio de vigorosas irrigações com soro fisiológico ou água destilada estéril a cada troca de instrumentos (Bourreau et al., 2015). No entanto, o soro fisiológico apresentou tensão superficial significativamente superior às demais soluções estudadas, conforme Tabela 8.

Em relação ao preparo do canal radicular utilizando o sistema recíprocante de lima única, este apresenta a vantagem de proporcionar um tratamento mais rápido. Porém, isto contrasta com os conceitos tradicionais de limpeza e modelagem, em que a limpeza é uma função atribuída aos procedimentos de irrigação, e as soluções irrigadoras requerem um tempo considerável para executar esta tarefa. Assim, no contexto de desbridamento e desinfecção do canal radicular, as soluções são mantidas por um curto período de tempo no interior do canal radicular (Paque et al., 2011). Esse fato faz com que haja a recomendação da utilização de concentrações maiores e renovação constante da substância durante preparo químico mecânico (Baratto-Filho et al., 2004).

Os achados da presente pesquisa estão em consonância com os estudos de Haapasalo et al., (2005); Basmaci et al., (2013); Karatas et al., (2015); Marinho et al., (2015); Neves et al., (2016) em relação à descontaminação obtida pelo preparo mecânico. A análise por cultura conduzida no estudo de Martinho et al. (2014) revelou que tanto a instrumentação recíprocante com lima única quanto técnicas de instrumentação rotatória mostraram eficácia semelhante na redução da contaminação. Estes resultados foram corroborados por Machado et al. (2013), que compararam *in vitro* os sistemas com movimento recíprocante e rotatório por um método da cultura bacteriana e relataram uma redução bacteriana maior que 94%, independentemente do sistema de instrumentação testado. Alves et al. (2012) mostraram, por um estudo *in vitro* utilizando PCR e cultura, uma redução altamente significativa na contagem bacteriana intracanal, utilizando técnicas de instrumentação de lima única.

Durante a irrigação dos canais radiculares com biofilme microbiano, a primeira camada de micro-organismo pode ser diretamente afetada por uma

concentração relativamente alta de irrigante ou solução desinfetante. Por outro lado, a matriz extracelular bloqueará o efeito da solução nas camadas mais profundas, as quais podem ainda conter micro-organismos viáveis. A instrumentação endodôntica poderá perturbar a organização do biofilme e expor esses micro-organismos embebidos à ação dos agentes de desinfecção. No entanto, como é sabido, as limas endodônticas não são capazes de tocar em todas as paredes do canal radicular (Wu et al., 2002, 2003) e micro-organismos podem ainda remanescer em seu interior, bem como nos túbulos dentinários, após instrumentação e irrigação (Moodnik et al., 1976; Nair et al., 2005).

A associação de análise por cultura microbiana e por microscopia de fluorescência (MCVL) permite determinar a viabilidade celular e identificar micro-organismos tanto no interior dos túbulos dentinários quanto células planctônicas suspensas na luz do sistema de canais radiculares. Entre os vários métodos para identificar bactérias no estado VBNC, a análise de fluorescência é usada comumente com técnicas de coloração de vitalidade celular para determinar o perfil de viabilidade, arquitetura e distribuição espacial em biofilmes microbianos (Delgado et al., 2013, Arias-Moliz et al., 2014).

Os túbulos dentinários têm sido sugeridos como uma possível fonte de bactérias para causar a infecção pós-tratamento e assim manter uma infecção intrarradicular persistente, sendo responsável pelo ressurgimento da periodontite apical. Esta observação ressalta a importância de se atingir uma adequada desinfecção do sistema de canais radiculares para um resultado previsível do tratamento a longo prazo (Vieira et al., 2012).

De tal modo, a dentina humana permanece como o material mais fidedigno para o estudo da invasão bacteriana ou desinfecção dos túbulos dentinários (Gutierrez et al., 1990; Safavi et al., 1990; Wong e Cheung, 2014). Porém, ainda é escasso o número de pesquisas que utilizam óleos essenciais como soluções irrigadoras em dentes humanos extraídos (Sadr et al., 2006; Samadi et al., 2011; Abbaszadegan et al., 2015; Sedigh-Shams et al., 2016) e nenhum trabalho foi encontrado avaliando sua ação sobre a dentina radicular.

Neste trabalho, para melhorar a previsibilidade da obtenção da contaminação em profundidade na dentina, foi utilizada a técnica de inoculação por centrifugação, baseado em Ma et al. (2011), o que resulta na presença densa de



micro-organismos nos túbulos dentinários, como verificado por MCVL após a coloração e análise por fluorescência (Figuras 12 a 14). Os ciclos de centrifugação tiveram sua força (g) aumentada gradativamente, de modo a impedir a formação de um rápido acúmulo na superfície da dentina, obliterando a entrada dos túbulos dentinários.

A abundância ou a falta de nutrientes no meio também afetam o desenvolvimento de biofilmes de *E. faecalis*. Em ambientes substancialmente ricos, o biofilme apresenta morfologia regular, enquanto que em condições privação de nutrientes, o biofilme é irregular e escasso. Assim, no presente estudo, durante o período de indução da inoculação o meio de cultura foi substituído a cada 48 horas, para proporcionar uma fonte constante de nutrientes e remover células mortas (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013).

Estudos prévios também utilizaram o protocolo de contaminação de Ma et al. (2011) e avaliação da ação antimicrobiana por MCVL para o *E. faecalis* (Wang et al., 2012; Wang et al., 2013; Arias-Moliz et al., 2014; Du et al., 2014; Du et al., 2015). Ma et al., (2011) e Du et al. (2014) relataram que a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras é dependente da concentração e do tempo de exposição. Em ambas pesquisas, o NaOCl 6% foi mais efetivo contra o *E. faecalis* quando comparado ao NaOCl em menores concentrações e à clorexidina líquida 2%. Wang et al. (2012) avaliaram a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras acrescidas de um agente surfactante para diminuir a tensão superficial das mesmas. No entanto, o NaOCl 6% teve melhor ação no tempo de exposição de 3 minutos mesmo sem a adição do surfactante. Resultado semelhante foi observado por Wang et al. (2013), que avaliaram o efeito negativo da *smear layer* nas propriedades antimicrobianas das soluções irrigadoras de NaOCl e clorexidina sobre a dentina. Assim mesmo, o NaOCl 6% mostrou maior atividade antimicrobiana. Du et al. (2015) verificaram um aumento da efetividade antimicrobiana dos cimentos obturadores endodônticos em canais irrigados previamente com NaOCl 5%.

Outros estudos avaliaram a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras por meio de MCVL, porém a análise foi realizada em biofilmes de *E. faecalis* formado em diferentes substratos, não sendo avaliada a contaminação no interior dos túbulos dentinários (Zapata et al, 2008; Shen et al., 2011; Guerreiro-Tanumaru et al., 2013; Hohscheidt et al., 2013; Wong et al., 2014; Neelakantan et al. 2015). No entanto, estes

trabalhos não esclarecem a maneira como as raízes foram clivadas para a análise em MCVL (Wang et al, 2012; Wang et al., 2013; Du et al., 2014). Mesmo Zapata et al. (2008) que utilizaram dentes bovinos, não elucidaram como foi realizada a separação da raiz. Somente Arias-Moliz et al. (2014) relatam que as raízes foram seccionadas verticalmente com uma máquina de corte de precisão com solução salina como irrigante, isto feito após a inoculação e tratamento dos substratos radiculares. Outros autores realizaram o seccionamento previamente à contaminação, sendo reposicionados com cera utilidade (Neelakantan et al., 2014) e em microtubos de centrífuga *ependorf's* (Hohscheidt et al., 2013) para executar a instrumentação do canal radicular, situação que não expõe uma superfície fresca de dentina necessária para avaliação em microscopia confocal. Assim, no presente estudo, foi verificado em ensaio piloto que cortes feitos no sentido transversal da raiz pela máquina de corte de precisão geraram superfícies planas e regulares, melhorando o ajuste de foco e facilitando a visualização da dentina em MCVL (Andrade et al., 2015).

No protocolo original, em que foram utilizados cilindros de dentina humana, o período de incubação para inoculação foi de 24 h (Ma et al., 2011; Wang et al., 2012) sendo ajustado para 5 dias (Arias-Moliz et al., 2014) e 3 semanas (Wang et al. 2013; Du et al., 2014; Du et al., 2015). No presente estudo, foi realizado um ensaio piloto, onde após 15 dias de incubação já foi possível observar o mesmo padrão de contaminação dos túbulos dentinários obtido em 21 dias.

As imagens obtidas das fatias de dentina nos três terços radiculares dos dentes possibilitaram avaliar a redução microbiana no interior dos túbulos dentinários submetidos aos diferentes tratamentos. Porém, por este método não foi possível identificar se a célula no interior dos túbulos dentinários correspondia ao *E. faecalis* ou à *C. albicans*.

Os resultados em MCVL mostraram que as soluções irrigadoras referentes à blenda de *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL, hipoclorito de sódio 5,25% e clorexidina gel 2% apresentaram os melhores resultados de ação antimicrobiana no interior da dentina radicular (Tabela 11), sendo estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do grupo controle negativo - Tween 80 a 0,1% ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos na redução da contaminação dos túbulos dentinários, verificou-se que a clorexidina gel 2% foi mais efetiva nos terços

cervical e apical. As demais soluções irrigadoras estudadas não apresentaram diferença de ação antimicrobiana em relação ao terço radicular. No terço cervical, as soluções irrigadoras mais efetivas foram a blenda *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL e a clorexidina gel 2%, sendo diferentes estatisticamente do grupo controle negativo. No terço médio, a blenda *C. martinii* e *T. riparia* 5,0 mg/mL foi a única solução que apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo. Já no terço apical, as blendas demonstraram ação estatisticamente semelhante aos grupos controle positivo, porém somente estes apresentaram diferença significativa com o controle negativo (Tabela 12).

Apesar de utilizar um ambiente natural (túbulos dentinários humanos) nos estudos *ex vivo*, é importante compreender que modelos experimentais também têm limitações. A contaminação dos túbulos dentinários obtida pela centrifugação pode ser mais densa e maciça do que a encontrada nas situações *in vivo*, resultando em um grande desafio para sua erradicação por meio do preparo químico-mecânico. No entanto, o delineamento experimental utilizado neste estudo permite um elevado nível de uniformização das condições, cuja obtenção é muito complexa em estudos *in vivo* (Wang et al., 2012).

No presente trabalho, não foi possível verificar túbulos dentinários livres de micro-organismos após o preparo químico-mecânico em nenhum dos grupos. Isto porque pode ser difícil ou impossível erradicar completamente bactérias dos canais radiculares em todos os casos (Du et al., 2014).

Assim, a blenda composta pelos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* na concentração 5,0 mg/mL foi identificada como a combinação de óleos mais ativa frente aos endopatógenos estudados. Além disso, esta apresentou ação efetiva tanto no canal radicular como no interior da dentina radicular infectados com *E. faecalis* e *C. albicans*, podendo esta propriedade ser facilitada por sua baixa tensão superficial, contudo, sem serem agressivos aos tecidos vitais avaliados pelo método adotado nesta pesquisa.

Apesar dos resultados apontarem para o potencial de uso da blenda dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* como alternativa às soluções irrigadoras utilizadas em endodontia, estudos adicionais são ainda necessários para elucidar outras características importantes antes da indicação de seu uso como solução irrigadora, como capacidade de dissolução tecidual e efeito sobre a dentina e *smear*

*layer* formada durante o preparo químico-mecânico. Estas respostas, aliadas às propriedades da blenda de *C. martinii* e *T. riparia* quanto à ação antimicrobiana efetiva comprovada sobre os endopatógenos resistentes *E. faecalis* e *C. albicans*, baixa citotoxicidade e baixa tensão superficial identificadas neste estudo, complementarão sua indicação como solução irrigadora em Endodontia.

## 7 CONCLUSÃO

Dentre os óleos essenciais e suas combinações testadas no presente estudo, a blenda composta dos óleos de *C. martinii* e *T. riparia* (1:1) conferiu os melhores resultados de atividade antimicrobiana nos ensaios *in vitro*, tanto frente a células planctônicas como sobre biofilmes de *E. faecalis* e *C. albicans*.

Os compostos majoritários identificados nos óleos selecionados foram o trans-geraniol no óleo essencial de *C. martinii* (85,39%) e sesquiterpenos oxigenados no óleo de *T. riparia* (50,88%).

Os óleos mais ativos apresentaram adequada biocompatibilidade durante os testes de citotoxicidade, onde o óleo de *C. martinii* demonstrou moderada citotoxicidade sobre queratinócitos humanos e o óleo essencial de *T. riparia* apresentou ausência de citotoxicidade.

Quando analisada a tensiometria das soluções irrigadoras em estudo, verificou-se valor significativamente menor para o óleo essencial de *C. martinii* (29,8 mN/m) seguido pelo óleo essencial de *T. riparia* (36,1 mN/m), do que para o hipoclorito 2,5% (67,69 mN/m) e o soro fisiológico utilizado com a clorexidina gel 2% (73,7 mN/m).

Além disso, esta combinação de óleos na concentração de 5,0 mg/mL apresentou ação antimicrobiana na redução destes micro-organismos em biofilme misto nas paredes do canal radicular principal de dentes humanos extraídos, bem como sobre micro-organismos confinados no interior de túbulos dentinários, com resposta estatisticamente semelhante à clorexidina gel 2% e hipoclorito de sódio 5,25%.

Os resultados obtidos em testes *in vitro* e *ex vivo* permitiram concluir que a blenda dos óleos essenciais de *C. martinii* e *T. riparia* na concentração de 5,0 mg/mL apresenta efetiva atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *C. albicans*, equivalente às soluções irrigadoras sintéticas convencionalmente utilizadas em endodontia, podendo ser uma opção à clorexidina e ao hipoclorito de sódio, do ponto de vista microbiológico.

## REFERÊNCIAS\*

- Abbaszadegan A, Gholami A, Mirhadi H, Saliminasab M, Kazemi A, Moein MR. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ferula gummosa* plant essential oil compared to NaOCl and CHX: a preliminary in vitro study. *Restor Dent Endod*. 2015 Feb;40(1):50-7. doi: 10.5395/rde.2015.40.1.50.
- Abbaszadegan A, Sahebi S, Gholami A, Delroba A, Kiani A, Iraj A et al. Time-dependent antibacterial effects of *Aloe vera* and *Zataria multiflora* plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*. *J Investig Clin Dent*. 2016 Feb;7(1):93-101. doi: 10.1111/jicd.12123.
- Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod*. 1981 Aug;7(8):376-7.
- Adams, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectrometry. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.
- Aliogiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*. 2001 Sep;49(9):4168-70.
- Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J*. 2012 Sep;45(9):871-7.
- Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci*. 2015 Nov-Dec;23(6):591-8.
- Araújo LLN. Características morfofisiológicas, produção e composição de óleo essencial em folhas de *tetradenia riparia* (hochst) codd- lamiaceae cultivada em diferentes níveis de sombreamento [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas; 2014.

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. J Endod. 2014 Dec;40(12):1999-2002.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. Food Chem Toxicol. 2008 Feb;46(2):446-75.

Baratto-Filho F, de Carvalho JR Jr, Fariniuk LF, Sousa-Neto MD, Pécora JD, da Cruz-Filho AM. Morphometric analysis of the effectiveness of different concentrations of sodium hypochlorite associated with rotary instrumentation for root canal cleaning. Braz Dent J. 2004;15(1):36-40.

Bashetty K, Hegde J. Comparison of 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite irrigating solutions on postoperative pain: a randomized clinical trial. Indian J Dent Res. 2010 Oct-Dec;21(4):523-7. doi: 10.4103/0970-9290.74225.

Basmaci F, Oztan MD, Kiyani M. *Ex vivo* evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. Int Endod J. 2013 Sep;46(9):823-30.

Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. J Endod. 2000 Dec;26(12):695-8.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006 Jan;39(1):10-7.

Bersan SM, Galvão LC, Goes VF, Sartoratto A, Figueira GM, Rehder VL, et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. BMC Complement Altern Med. 2014 Nov 18;14:451. doi: 10.1186/1472-6882-14-451.

Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Braz J Med Biol Res. 2007 Mar;40(3):349-56.

Botelho MA, Barros G, Queiroz DB, Carvalho CF, Gouvea J, Patrus L et al.

Nanotechnology in phytotherapy: antiinflammatory effect of a nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* in acute periodontitis in rats. *Phytother Res*. 2016

Jan;30(1):152-9. doi: 10.1002/ptr.5516.

Bourreau MLS, Nunes ARG, Souza Filho FJ. Substâncias químicas auxiliares e irrigação. In: Endodontia passo a passo: evidências clínicas. Souza Filho FJ.

Organizador. São Paulo: Artes médicas, 2015. p. 99-111.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981 Aug;89(4):321-8.

Câmara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM. Soluções irrigadoras utilizadas para o preparo biomecânico de canais radiculares. *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2010; 10(1): 127-33.

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci*. 2007 Jun;90(6):2580-95.

Cavalcanti YW, Pérez ALAL, Xavier GDR, Almeida LFD. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre micro-organismos do canal radicular. *Rev Odontol Unesp*. 2011; 40 (5): 208-14.

Cha JD, Jung EK, Kil BS, Lee KY. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. *J Microbiol Biotechnol*. 2007 Dec;17(12):2061-5.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001 Sep;183(18):5385-94.

Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*. 2007 Jun;33(6):652-62. Epub 2007 Mar 23. Review. Erratum in: *J Endod*. 2007 Nov;33(11):1289.



Chávez de Paz LE. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. J Endod. 2012 Mar;38(3):318-23.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlén G, Svensäter G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. Int Endod J. 2007 May;40(5):344-55.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod. 2010 Jan;36(1):70-7.

Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. Int Endod J. 2003 Jul;36(7):500-8.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2008 Oct;41(10):873-82.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. J Endod. 2006 May;32(5):434-7.

CLSI (2002). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica – 2ª. edição, M27-A2, Vol. 22 no. 15.

CLSI (2005). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico - 6ª. edição, M7-A6, Vol. 23, no. 2.

CLSI (2009) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 8ª edição, M07-A8, vol. 29, no. 2,

Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. J Endod. 2007 Jun;33(6):690-2.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999 May 21;284(5418):1318-22.

Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of

chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Jun;99(6):768-72.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. J Endod. 2011 Aug;37(8):1134-8.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, de Moraes IG, Garcia RB et al. Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. Int J Oral Sci. 2013 Mar;5(1):32-6.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(6): 2950-2958.

Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. J Endod. 2014 Apr;40(4):509-14.

Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Combined antibacterial effect of sodium hypochlorite and root canal sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. J Endod. 2015 Aug;41(8):1294-8. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.023.

Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005 Feb 28;97(2):305-11.

Duarte MC, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol. 2007 May 4;111(2):197-201.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod. 2006 Jun;32(6):527-31.

E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. Genet Mol Res. 2015 Nov 23;14(4):14790-801.

Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* 2007 Apr;21(4):308-23.

Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2002 Apr;35(4):321-9.

Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Savagnac A, Abderraba M, et al. The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *J Sci Food Agric.* 2010 Feb;90(3):462-70. doi: 10.1002/jsfa.3840.

Ehrich DG, Brian JD Jr, Walker WA. Sodium hypochlorite accident: inadvertent injection into the maxillary sinus. *J Endod.* 1993 Apr;19(4):180-2.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):221-8.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Periodontite apical secundária. Cap 11 In: A infecção endodôntica e sua resolução. Ferrari PHP, Bombana AC. Editora Santos 2010 358p.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001 Jul;27(7):452-5.

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Aug;18(4):234-9.

Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod.* 2002 Feb;28(2):68-71.

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Aug;18(4):234-9.

Freire AM, Soares AJ. O uso da clorexidina (CHX) gel 2%. In: In: Hizatugu. R.; Fregnani, E. *Endodontia: Uma visão contemporânea*. São Paulo: Santos, 2012.

Freires I de A, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, Alencar SM, Figueira GM, de Oliveira Rodrigues JA, Duarte MC, Rosalen PL. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida spp.*, and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS One*. 2014 Jun 5;9(6):e99086. doi: 10.1371/journal.pone.0099086.

Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira GM et al. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:985832. doi: 10.1155/2011/985832.

Galvão LC, Furletti VF, Bersan SM, da Cunha MG, Ruiz AL, de Carvalho JE, et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012:751435. doi: 10.1155/2012/751435.

Gao Y, Jiang X, Lin D, Chen Y, Tong Z. The starvation resistance and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. *J Endod*. 2016 Jun 14.

Gazim ZC, Amorim AC, Hovell AM, Rezende CM, Nascimento IA, Ferreira GA, et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil. *Molecules*. 2010 Aug 10;15(8):5509-24. doi: 10.3390/molecules15085509.

Giardino L, Estrela C, Generali L, Mohammadi Z, Asgary S. The *in vitro* effect of irrigants with low surface tension on *Enterococcus faecalis*. *Iran Endod J*. 2015 Summer;10(3):174-8. doi: 10.7508/iej.2015.03.006.

Gomes, BPFA. Microbiologia aplicada. In: Endodontia passo a passo: evidências clínicas. Souza Filho FJ. Organizador. São Paulo: Artes médicas, 2015. p. 26-30.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2001 Sep;34(6):424-8.

Gomes BPFA, Montagner F, Martinho FC. Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas. In: Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica Vol 1: Spolidorio DMP, Duque C. São Paulo: Artes Médicas, 144p, 2013.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008 May;34(5):537-40.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004 Apr;19(2):71-6.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Aug;102(2):247-53.

Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MM, Bernabé PF. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. J Appl Oral Sci. 2008 Mar-Apr;16(2):137-44.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. J Endod. 2013 Mar;39(3):346-50. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.027.

Gutiérrez JH, Jofré A, Villena F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990 Apr;69(4):491-501.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics*. 2005 10: 77-102.

Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1375-9.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007 Aug;33(8):917-25.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010 Apr;54(2):291-312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001.

Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Dec;18(6):389-92.

Hasan BS, Baksi BG. Fungi in endodontic infection. In: Ashraf FF. *Endodontic Microbiology*, Wiley-Blackwell. 2009. p. 164-94.

Henriques AT, Simões-Pires CA, Konrath EL, Apel MA. Óleos essenciais: importância e características terapêuticas. In: Yunes RA, Cechinel-Filho V. *Química dos produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 4. ed. Itajaí/SC: Univalli Editora, 2014. p. 251-98.

Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1997;26:1S-11S.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* 1998 46 (9), 3590-3595 doi: 10.1021/jf980154m

Hohscheidt GL, Böttcher DE, Parolo CCF, Montagner F, Grecca FS. Response of *E. faecalis* biofilms to different associations of auxiliary substances during root canal preparation: A confocal laser microscopy analysis. *Microscopy Research and Technique*. 2013 June;76(6):658–62.

- Karataş E, Gültekin E, Arslan H, Kirici DÖ, Alsancak M, Topçu MÇ. Evaluation of instrumentation systems in reducing *E. faecalis* from root canals: TF adaptive and ProTaper next versus single file systems. *Int J Artif Organs*. 2015 Mar;38(3):161-4.
- Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J*. 2006 Dec;32(3):112-5.
- Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics* 2012 22: 99–123.
- Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod*. 2000 Jun;26(6):315-7.
- Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 May;46(5):1302-9.
- Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod*. 2000 Nov;26(11):652-5.
- Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):167-71.
- Lobo PL, Fonteles CS, Marques LA, Jamacaru FV, Fonseca SG, de Carvalho CB, et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: a randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine*. 2014 Jul-Aug;21(8-9):1043-7. doi: 10.1016/j.phymed.2014.04.021.
- Lodhia MH, Bhatt KR, Thaker VS. Antibacterial activity of essential oils from palmarosa, evening primrose, lavender and tuberose. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009 71(2):134-136. doi:10.4103/0250-474X.54278.
- Love, R. Microbiology of caries and dentinal tubule infection In: Ashraf FF. *Endodontic Microbiology*, Wiley-Blackwell. 2009. p. 164-94.

Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001 Jul;34(5):399-405.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Ver Oral Biol Med. 2002;13(2):171-83.

Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J. The Sensitivity of Endodontic *Enterococcus* spp. Strains to Geranium Essential Oil. Molecules. 2015 Dec 21;20(12):22881-9. doi: 10.3390/molecules201219888.

Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. J Endod. 2011 Oct;37(10):1380-5.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. Int Endod J. 2013 Nov;46(11):1083-7.

Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: ideal candidate for anti-cariogenic formulations. Fitoterapia. 2009 Sep;80(6):313-9. doi: 10.1016/j.fitote.2009.04.004.

Mareending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. Int Endod J. 2007 Oct;40(10):786-93.

Martin BJ, Campbell PM, Rees TD, Buschang PH. A randomized controlled trial evaluating antioxidant-essential oil gel as a treatment for gingivitis in orthodontic patients. Angle Orthod. 2016 May;86(3):407-12. doi: 10.2319/041515-251.1.

Marinho AC, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HR, Gomes BP. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? Int Endod J. 2015 Jun;48(6):542-8.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and



rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod.* 2014 May;40(5):625-9.

Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol.* 2008 Sep;47(3):167-73. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis in vitro*. *J Endod.* 2004 Apr;30(4):218-9.

Melo NI, de Carvalho CE, Fracarolli L, Cunha WR, Veneziani RC, Martins CH et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Braz J Microbiol.* 2015 Jun 1;46(2):519-25. doi: 10.1590/S1517-838246246220140649.

Meneghini, G.; Okino-Neto, K.; Hizatugu. R. Endodontia em sessão única. In: Hizatugu. R.; Fregnani, E. Endodontia: Uma visão contemporânea. São Paulo: Santos, 2012.

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009 Apr;42(4):288-302. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01540.x.

Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine as a root canal irrigant: a literature review. *J Oral Sci.* 2014 Jun;56(2):99-103.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998 Jan;31(1):1-7.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Jun 5;83(11):757-66.

Moodnik RM, Dorn SO, Feldman MJ, Levey M, Borden BG. Efficacy of biomechanical instrumentation: a scanning electron microscopic study. *J Endod.* 1976 Sep;2(9):261-6.

Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. J Endod. 2009 Jul;35(7):1023-7. doi: 10.1016/j.joen.2009.04.002.

Mothana RA, Al-Rehaily AJ, Schultze W. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two endemic *Soqotri Commiphora* species. Molecules. 2010 Feb 1;15(2):689-98. doi: 10.3390/molecules15020689.

Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. J Endod. 2008 Jan;34(1):66-70.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, Trindade, RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy 2007; 17(1): 108-113.

Najzar-Fleger D. [The incidence of *Candida* and *Rhodotorula* in the root canal]. Acta Stomatol Croat. 1969;4(4):174-80.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Feb;99(2):231-52.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular 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 Dec;16(12):580-8.

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals 2013 6(12), 1451–74.  
doi.org/10.3390/ph6121451

Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser *in vitro*. Int Endod J. 2015 Jun;48(6):602-10.

Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Clinical antibacterial effectiveness of root canal preparation with reciprocating single-instrument or continuously rotating multi-instrument systems. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):25-9.

Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J*. 1994 Jul;27(4):218-22.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004 Jan;37(1):38-41.

Oladusu IA, Usman LA, Olawore NO, Atata RF. Antibacterial activity of rhizomes essential oils of types of *Cyperus articulatus* Growing in Nigeria. *Advances in Biological Research*. 2011; 5(3): 179-183.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, Duarte MA. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J*. 2012 Feb;45(2):162-8.

Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: *in vitro* study. *J Endod*. 2010 May;36(5):842-6.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Aug;46(8):2720-2.

Paqué F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):1044-7. doi: 10.1016/j.joen.2009.04.026.

Paqué F, Zehnder M, De-Deus G. Microtomography-based comparison of reciprocating single-file F2 ProTaper technique versus rotary full sequence. *J Endod*. 2011 Oct;37(10):1394-7. doi: 10.1016/j.joen.2011.06.031.

Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppini-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. J Dent. 2009 Dec;37(12):903-8. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.004.

Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. J Endod. 1985 Dec;11(12):525-8.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001 Sep;34(6):429-34.

Pereira CA, Costa AC, Liporoni PC, Rego MA, Jorge AO. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. J Infect Public Health. 2016 May-Jun;9(3):324-30. doi: 10.1016/j.jiph.2015.10.012.

Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. Int Endod J. 1995 Mar;28(2):95-9.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003 Jan;36(1):1-11.

Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*– the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. Endodontic Topics. 2003; 6: 135–159. doi:10.1111/j.1601-1546.2003.00040.x

Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an *in vitro* study. J Endod. 2010 Jan;36(1):83-6. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.040.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug;36(8):1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007.

Rodrigues EA, Henrique A, Alves GB. Uso do hipoclorito de sódio em Endodontia. In: Hizatugu R, Fregnani E. Endodontia: Uma visão contemporânea. São Paulo: Santos, 2012.

Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. J Endod. 2006 Apr;32(4):331-3.

Sadr Lahijani MS, Raoof Kateb HR, Heady R, Yazdani D. The effect of German chamomile (*Marticaria recutita* L.) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia* L.) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study. Int Endod J. 2006 Mar;39(3):190-5.

Safavi KE, Spangberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. J Endod. 1990 May;16(5):207-10.

Samadi N, Zaree R, Bakhtiar H, Salehnia A, Azimi S. Comparative antibacterial efficacy of endemic *Satureja khuzistanica jamzad* essential oil, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate solutions as root canal irrigations. Dent Res J (Isfahan). 2011 Winter;8(1):28-32.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2004; 35: 275-80.

Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. Int Endod J. 2005 Oct;38(10):735-42.

Sedigh-Shams M, Badiiee P, Adl A, Sarab MD, Abbaszadegan A, Nabavizadeh M. *In vitro* comparison of antimicrobial effect of sodium hypochlorite solution and *Zataria multiflora* essential oil as irrigants in root canals contaminated with *Candida albicans*. J Conserv Dent. 2016 Jan-Feb;19(1):101-5. doi: 10.4103/0972-0707.173212.

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

Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997 Jul;84(1):68-73.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011 May;37(5):657-61.

Scherer R, Wagner R, Duarte MCT, Godoy HT. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Plantas med.* [online]. 2009 11(4):442-49. ISSN 1516-0572. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>.

Signoretto C, Lleò MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol.* 2000 May;66(5):1953-9.

Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J.* 2001 Mar;34(2):120-32.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998 Jun;24(6):414-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):85-94.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jun;107(6):870-8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3.

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

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

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. Int Endod J. 1997 Mar;30(2):91-5.

Spanó JC, Barbin EL, Santos TC, Guimarães LF, Pécora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. Braz Dent J. 2001;12(3):154-7.

Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. J Endod. 2013 Apr;39(4):473-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.024.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006 Feb;32(2):93-8.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Jan;85(1):86-93.

Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endod Topics 2004;9:27–36.

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2004 Feb;19(1):61-4.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. Int Endod J. 2002 Sep;35(9):735-9.

- Taschieri S, Del Fabbro M, Samaranayake L, Chang JW, Corbella S. Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *J Investig Clin Dent*. 2014 Aug;5(3):163-70.
- Taşman F, Cehreli ZC, Oğan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. *J Endod*. 2000 Oct;26(10):586-7.
- Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *Eur J Dent*. 2013 Sep;7(Suppl 1):S71-7. doi: 10.4103/1305-7456.119078.
- Valgas C, Souza SM, Smania EA, Smania JR. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol*. 2007, vol.38, n.2, p.369-380. ISSN 1517-8382. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.
- Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1040-52.
- Vieira AR, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):250-4.
- Waltimo TM, Ørstavik D, Meurman JH, Samaranayake LP, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Aug;15(4):245-8.
- Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997 Mar;30(2):96-101.
- Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):948-53.
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod*. 2013 Nov;39(11):1395-400.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997 Apr;23(4):229-31.



Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. J Endod. 2014 Jun;40(6):825-9.

Wu MK, Barkis D, Roris A, Wesselink PR. Does the first file to bind correspond to the diameter of the canal in the apical region? Int Endod J. 2002 Mar;35(3):264-7.

Wu MK, van der Sluis LW, Wesselink PR. The capability of two hand instrumentation techniques to remove the inner layer of dentine in oval canals. Int Endod J. 2003 Mar;36(3):218-24.

Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, Campanelli AP, Garcia RB. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. J Endod. 2008 Oct;34(10):1198-201.

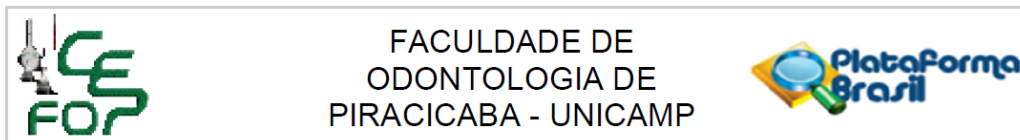
Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006 May;32(5):389-98.

Zoghbi MGB, Andrade EHA, Oliveira AJ, Carreira LMM. Yield and chemical composition of the essential oil of the stems and rhizomes of *Cyperus articulatus* L. cultivated in the state of Pará, Brazil. J. Essect. Oil Res. 2006; 18: 10-12.

Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. J Endod. 2006 Aug;32(8):722-6. Epub 2006 May 11.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILMES ENDODÔNTICOS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS E CANDIDA ALBICANS

**Pesquisador:** Caroline Zamin

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30596014.5.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 684.792

**Data da Relatoria:** 11/06/2014

##### Apresentação do Projeto:

O projeto a ser desenvolvido terá a finalidade de avaliar as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de diferentes espécies medicinais e aromáticas para comprovar sua indicação como solução irrigadora durante a terapia endodôntica. Para isso, será realizada triagem da atividade antimicrobiana dos diferentes óleos essenciais contra cepas de *E. faecalis* e *C. albicans*, por meio do método da microdiluição, para determinação da concentração inibitória mínima de cada óleo sobre os micro-organismos. Em seguida, será também definida a concentração bactericida ou fungicida mínima. Os óleos essenciais com potencial para uso como antimicrobiano serão fracionados, definindo-se a fração de melhor atividade. Ainda, será avaliada a ação do óleo e/ou fração mais ativa frente a biofilmes formados pelos micro-organismos alvo. Por fim, biofilmes de *E. faecalis* e *C. albicans* formados sobre dentina radicular de dentes humanos extraídos serão expostos aos óleos definidos com melhor atividade sobre estes micro-organismos. A avaliação da ação destas substâncias sobre o biofilme endodôntico será realizada por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser em cada terço radicular. Assim, pretende-se definir se os óleos essenciais testados apresentam características antimicrobianas ideais para serem indicados como substâncias químicas auxiliares em Endodontia. Serão utilizados 90 dentes humanos extraídos pertencentes ao Banco de Dentes Humanos da UNOCHAPECÓ os quais retornarão ao mesmo após

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

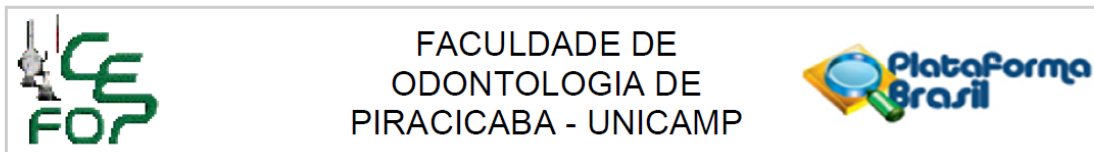
**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 684.792

o experimento. Foram definidas para estudo no presente projeto, 24 plantas medicinais e/ou aromáticas pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas CPQBA/UNICAMP. A pesquisa será realizada nas dependências do laboratório de Microbiologia e laboratório de Farmacologia/Toxicologia do CPQBA-UNICAMP e laboratório de Endodontia da FOP-UNICAMP com cronograma de 3 anos.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Trata-se de um estudo "in vitro" que tem o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de 24 (vinte e quatro) plantas medicinais e/ou aromáticas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Químicas - CPQBA/UNICAMP a serem utilizadas contra patógenos endodônticos, e o potencial de uso do(s) óleo(s) ativo(s) como solução irrigadora em endodontia tendo como proposta a sua utilização em substituição ao hipoclorito de sódio. As cepas a serem testadas serão o *E. faecalis* e *C. albicans*, através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentrações, bactericida (MBC) ou fungicida (MFC) mínimas. Serão também fracionado(s) o(s) óleo(s) essencial(is) de melhor atividade e determinada a atividade de suas frações; quantificar os micro-organismos viáveis remanescentes no biofilme sobre blocos de dentina após a exposição às soluções teste; determinar a biocompatibilidade dos óleos ou frações de melhor atividade sobre células normais HaCat – queratinócito humano e sobre células epiteliais de rim de macaco verde – VERO.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos aos indivíduos da amostra pois é um estudo in vitro e será realizada em dentes humanos extraídos e que foram emprestados pelo BDH-Chapecó, conforme consta no documento em anexo, totalizando 90 (noventa) dentes.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É um estudo in vitro que utilizará material humano de um banco de dentes extraídos.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

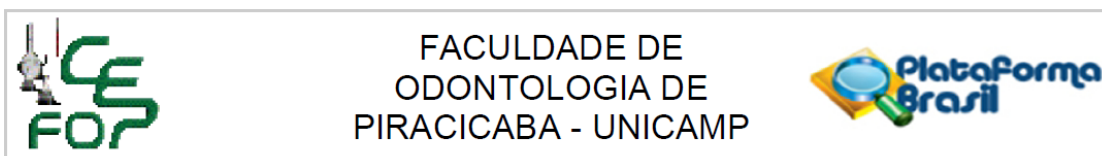
Não será obtido TCLE, já que os dentes foram obtidos do Banco de Dentes Humanos da Unochapecó. Os pesquisadores re-apresentaram as declarações solicitadas pelo CEP.

#### **Recomendações:**

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há mais pendências.

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52  
**Bairro:** Areião **CEP:** 13.414-903  
**UF:** SP **Município:** PIRACICABA  
**Telefone:** (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 684.792

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Protocolo CEP-FOP-UNICAMP 027/14. Recebeu parecer "Pendente" em reunião do CEP de 07/05/14 e foi aprovado em reunião de 11/06/14.

PIRACICABA, 11 de Junho de 2014

---

Assinado por:

**LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

**Bairro:** Areião

**CEP:** 13.414-903

**UF:** SP

**Município:** PIRACICABA

**Telefone:** (19)2106-5349

**Fax:** (19)2106-5349

**E-mail:** cep@fop.unicamp.br

## ANEXO 2 – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

13/08/2015

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"ESTUDO CLÍNICO DA COMUNIDADE MICROBIANA E DOS ASPECTOS IMUNOBIOLOGICOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES"**, protocolo nº 018/2014, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Augusto Rodrigues Lima, Daniel Rodrigo Herrera Morante, Marlos Barbosa Ribeiro e Thais Mageste Duque, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/05/2014, com alterações em 10/09/2014 e 12/08/2015.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"CLINICAL STUDY OF THE MICROBIAL COMMUNITY AND IMMUNOBIOLOGIC ASPECTS INVOLVED IN THE PULP AND PERIAPICAL DISEASES"**, register number 018/2014, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Augusto Rodrigues Lima, Daniel Rodrigo Herrera Morante, Marlos Barbosa Ribeiro and Thais Mageste Duque, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on May 07, 2014; with alterations on Sep 10, 2014 and Aug 12, 2015.

**Prof. Dra. Fernanda Miori Pascon**  
 Secretária  
 CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
 Coordenador  
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.