



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARCELLE MELO MAGALHÃES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia*
origanoides E SUA COMBINAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO FRENTE
AO BIOFILME DE *Candida albicans* E *Enterococcus faecalis***

SOBRAL-CE
2025

MARCELLE MELO MAGALHÃES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia*
origanoides E SUA COMBINAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO FRENTE
AO BIOFILME DE *Candida albicans* E *Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará (UFC)
como requisito para a obtenção do título
de mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Biologia
molecular e de microrganismo.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Oliveira
dos Santos Fontenelle.

Co-orientadores: Dra. Francisca Lidianne
Linhares de Aguiar.

Dr. Francisco César Barroso Barbosa

SOBRAL-CE

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

M167a Magalhães, Marcelle Melo.

Atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Lippia origanoides* e sua combinação com hidróxido de cálcio frente ao biofilme de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* / Marcelle Melo Magalhães. – 2025.

71 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa.

1. antibiofilme. 2. fibroblastos. 3. hidróxido de cálcio. 4. medicação intracanal. 5. produtos naturais. I. Título.

CDD

610

RESUMO

O uso de medicação intracanal é preconizado em alguns casos para maximizar o processo de desinfecção e alcançar o sucesso do tratamento endodôntico. Embora o hidróxido de cálcio seja a medicação mais utilizada atualmente, ainda há uma preocupação significativa sobre sua efetividade devido aos casos de reinfecção. Diante disso, a busca por veículos que potencializem a atividade do hidróxido de cálcio tem sido crescente. O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) e sua associação ao pó de hidróxido de cálcio sobre o biofilme multiespécie de 21 dias de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. O óleo das folhas de *L. origanoides* foi extraído por hidrodestilação e a análise química dos constituintes realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foi realizada a atividade antimicrobiana do óleo por microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração letal mínima (CLM). Foi avaliado o efeito sinérgico do composto natural com a Clorexidina (CHX) pelo método de *Checkerboard*, para determinar se os compostos seriam testados associados ou isolados. A atividade antibiofilme foi avaliada *in vitro*, a partir dos testes com cristal violeta, MTT e microscopia e *ex vivo*, onde foi formado o biofilme multiespécie em raízes de dentes humanos unirradiculares e realizado o tratamento utilizando o óleo essencial de *Lippia origanoides*, clorexidina e propilenoglicol como veículos para o hidróxido de cálcio, para avaliar a atividade antibiofilme nesse teste foram realizadas coletas microbiológicas antes e após os tratamentos e em seguida realizada as contagens das unidades formadoras de colônia. Foram realizados testes de citotoxicidade com eritrócitos e fibroblastos. Os resultados mostraram que o óleo essencial de *L. origanoides* tem como composto majoritário o Timol (94,53%). Quanto a atividade antimicrobiana, o OELO apresentou CIM de 1,250 µg/ml para *E. faecalis* e 312 µg/ml para *C. albicans*. O OELO e a CHX não apresentaram efeitos sinérgicos de acordo com o cálculo do ICIF, apesar de ter uma redução na CIM dos dois compostos quando combinados, diante disso optou-se por realizar os testes antibiofilme com os compostos separados, utilizando a clorexidina apenas como controle. Quanto atividade antibiofilme, os grupos tratados com óleo essencial, tanto *in vitro* como *ex vivo*, apresentou maior redução do biofilme multiespécie formado, sendo promissor na terapia endodôntica. Com relação a atividade hemolítica, o óleo apresentou CL₅₀ de 3.610 µg/ml, enquanto a clorexidina apresentou CL₅₀ de 688 µg/ml, sendo óleo menos tóxico do que a CHX. No ensaio com os fibroblastos o perfil foi semelhante, com o óleo apresentando-se menos tóxico que a clorexidina. A partir dos resultados desse estudo é possível concluir que o óleo essencial de *L. origanoides*, como veículo para o hidróxido de cálcio, exerceu bons efeitos antibiofilme frente ao biofilme maduro de *E. faecalis* e *C. albicans*. Diante disso, o óleo essencial de *L. origanoides* é um agente promissor no processo de desinfecção do sistema de canais radiculares.

Palavras-chave: antibiofilme; fibroblastos; hidróxido de cálcio; medicação intracanal; produtos naturais.

ABSTRACT

The use of intracanal medication is recommended in some cases to maximize the disinfection process and achieve successful endodontic treatment. Although calcium hydroxide is the most widely used medication today, there is still significant concern about its effectiveness due to cases of reinfection. Therefore, the search for vehicles that enhance the activity of calcium hydroxide has been increasing. The present study aims to evaluate the antimicrobial potential of *Lippia origanoides* essential oil (LOEO) and its association with calcium hydroxide powder on the 21-day multispecies biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. The oil from the leaves of *L. origanoides* was extracted by hydrodistillation and the chemical analysis of the constituents was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The antimicrobial activity of the oil was performed by broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC). The synergistic effect of the natural compound with Chlorhexidine (CHX) was evaluated by the Checkerboard method, to determine whether the compounds would be tested associated or isolated. The antibiofilm activity was evaluated in vitro, based on tests with crystal violet, MTT and microscopy and ex vivo, where the multispecies biofilm was formed in roots of single-rooted human teeth and treatment was performed using *Lippia origanoides* essential oil, chlorhexidine and propylene glycol as vehicles for calcium hydroxide. To evaluate the antibiofilm activity in this test, microbiological collections were performed before and after treatments and then the colony forming units were counted. Cytotoxicity tests were performed with erythrocytes and fibroblasts. The results showed that the essential oil of *L. origanoides* has Thymol as its major compound (94.53%). Regarding antimicrobial activity, OELO presented MIC of 1.250 µg/ml for *E. faecalis* and 312 µg/ml for *C. albicans*. OELO and CHX did not present synergistic effects according to the ICIF calculation, despite having a reduction in the MIC of both compounds when combined. Therefore, it was decided to perform the antibiofilm tests with the compounds separately, using chlorhexidine only as a control. Regarding antibiofilm activity, the groups treated with essential oil, both in vitro and ex vivo, presented a greater reduction in the multispecies biofilm formed, being promising in endodontic therapy. Regarding hemolytic activity, the oil presented LC50 of 3,610 µg/ml, while chlorhexidine presented LC50 of 688 µg/ml, being the oil less toxic than CHX. In the fibroblast assay, the profile was similar, with the oil being less toxic than chlorhexidine. Based on the results of this study, it is possible to conclude that the essential oil of *L. origanoides*, as a vehicle for calcium hydroxide, exerted good antibiofilm effects against the mature biofilm of *E. faecalis* and *C. albicans*. Therefore, the essential oil of *L. origanoides* is a promising agent in the process of disinfection of the root canal system.

Keywords: antibiofilm; fibroblasts; calcium hydroxide; intracanal medication; natural products.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Biofilme endodôntico	11
2.2 Tratamento endodôntico	13
2.3 Medicação intracanal	14
2.4 Uso de produtos naturais como medicação intracanal	16
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Coleta e identificação da planta	21
4.2 Extração do óleo essencial	21
4.3 Análise dos constituintes químicos por GC-MS	21
4.4 Cepas e condições de cultura	21
4.5 Preparação da substância teste para ensaios antimicrobianos	22
4.6 Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)	22
4.7 Obtenção da concentração letal mínima (CLM)	22
4.8 Efeito combinado entre a clorexidina e <i>Lippia origanoides</i>	23
4.9 Avaliação do efeito antibiofilme <i>in vitro</i>	23
4.9.1 Quantificação da biomassa do biofilme	23
4.9.2 Teste de viabilidade	24
4.9.3 Avaliação da morfologia do biofilme por microscópio óptico de luz	25
4.10 Avaliação do efeito antibiofilme em raízes de dentes humano	25
4.10.1 Preparo dos espécimes	25
4.10.2 Protocolo de contaminação dos espécimes	26
4.10.3 Protocolo de desinfecção	27
4.10.4 Diluição e Plaqueamento das Coletas	28
4.11 Atividade hemolítica	28
4.12 Citotoxicidade com fibroblastos	29
5 RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	39

REFERÊNCIAS	40
ANEXO 1.....	45
ANEXO 2.....	48

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico tem como objetivo reduzir a infecção dos canais radiculares e impedir que haja reinfecção por meio do desbridamento químico-mecânico e selamento hermético dos condutos (Polyzos *et al.*, 2018). A permanência dos microrganismos no interior do canal radicular após o tratamento primário resulta em infecções secundárias ou persistentes, sendo o principal fator que leva ao insucesso do tratamento (Nayaranan; Vaishnavi, 2010).

As infecções secundárias ou persistentes são de caráter polimicrobiano, com predominância de bactérias Gram-positivas e fungos (Lopes; Siqueira Jr, 2015). Esses microrganismos se aderem às paredes do canal radicular em forma de biofilme, o que contribui para uma resistência de 10-100 vezes maior a respostas imunes do hospedeiro e ao tratamento, representando um desafio para desinfecção. Além disso, apresentam alta patogenicidade, sendo capaz de induzir ou perpetuar lesões radiculares (Gulati; Nobile, 2016; Neelakantan *et al.*, 2017; Yoo *et al.*, 2020).

Enterococcus faecalis, uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa e a *Candida albicans*, levedura comumente isolada na cavidade oral, são as espécies mais frequentemente associadas a infecções persistentes do canal radicular, apresentando uma prevalência de, respectivamente, 24 a 70% e 1 a 17% das amostras (Siqueira; Rônças, 2004; Nair, 2006; Ghatole *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2021; Sy *et al.*, 2021). Esses microrganismos apresentam características semelhantes que permitem sua permanência no interior dos canais radiculares, dentre elas a capacidade de invadir túbulos dentinários, não necessitar de suporte para sua sobrevivência, sobreviver a elevados níveis de pH, a altas temperaturas e em ambientes pobres de nutrientes (Prada *et al.*, 2019; Alghamdi; Shakir, 2020; Yoo *et al.*, 2020).

Diante disso, o preparo químico-mecânico é o método principal para reduzir a microbiota de dentes infectados, mas em alguns casos não é o suficiente para obter a antissepsia necessária para o sucesso do tratamento, sendo indicado o uso da medicação intracanal (Zancan *et al.*, 2016). Atualmente, o hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ tem sido a medicação mais favorável devido suas propriedades físicas, biológicas e antimicrobianas, que é resultante da dissociação iônica dos íons Ca^{2+} e OH^- quando em contato com fluidos, tornando o pH do meio mais alcalino (Siqueira Jr; Lopes, 1999; Mohammadi; Dummer, 2011). O uso desse composto requer a associação com um

veículo, que pode ou não ter ação antimicrobiana e exerce um importante papel na velocidade do processo de dissociação (Pedrinha *et al.*, 2022).

Apesar de suas excelentes propriedades, alguns estudos mostram uma ação limitada do hidróxido de cálcio, acredita-se que isso ocorra devido aos mecanismos de sobrevivência que os microrganismos envolvidos na infecção intracanal apresentam. Com isso, várias substâncias com ação antimicrobiana têm sido testadas como veículo com o intuito de potencializar a ação da medicação (Siqueira Jr; Uzeda, 1997; Al-Sabawi, Mohammad; Shehab, 2020). De acordo com resultados recentes da literatura, o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ quando associado a veículos biologicamente ativos, como o paramonoclorofenol e a clorexidina, apresenta uma maior eficácia na redução dos microrganismos envolvidos na infecção endodôntica (Harshitha; Ranjini; Nadig, 2022; Khan *et al.*, 2022; Ratih; Mulyawati; Fajrianti, 2022).

Levando em consideração as limitações das medicações já utilizadas, vários compostos fitoterápicos têm sido estudados de forma isolada ou combinados com as medicações já existentes a fim de melhorar o prognóstico do tratamento endodôntico. (Veras *et al.*, 2014; Shakya *et al.*, 2019; Santana Neto *et al.*, 2020; Cosan *et al.*, 2022). Os produtos naturais, em especial os óleos essenciais, são conhecidos por sua ampla atividade antibacteriana, bem como atividade antifúngica. Além disso, são compostos que apresentam excelentes propriedades, como biocompatibilidade, propriedades biológicas e físicas favoráveis, e ótimo custo-benefício (Agnihotri *et al.*, 2022).

Lippia origanoides, comumente conhecida como “alecrim pimenta” é um arbusto da família Verbenacea encontrado na região do Nordeste brasileiro. Suas folhas produzem óleo essencial que apresentam, em sua composição química, compostos como o timol, carvacrol, p-cimeno, β -cariofileno e 1,8-cineol, que atuam sinergicamente possibilitando excelentes atividades antimicrobianas, tendo ação efetiva contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários e fungos, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Fontenelle *et al.*, 2007; Freires *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2019; Shakya *et al.*, 2019). Devido sua ampla atividade, *L. origanoides* é uma das plantas medicinais mais exploradas no Brasil. No entanto, não existem estudos na literatura que avaliem os efeitos do óleo essencial de *L. origanoides* como veículo para medicação intracanal sobre microrganismos resistentes do canal radicular. Nesse contexto, esse agente natural surge como uma alternativa viável para o desenvolvimento de medicamentos endodônticos.

Diante disso, em função da resistência de alguns microrganismos ao preparo químico-mecânico, da importância do uso da medicação intracanal como coadjuvante no controle das infecções endodônticas e das limitações das medicações já utilizadas no tratamento de canal, torna-se evidente a importância de avaliar o efeito do óleo essencial de *L. origanoides* sobre a viabilidade do biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilme endodôntico

A infecção endodôntica é caracterizada pela penetração de microrganismos da cavidade oral no interior dos canais radiculares, podendo ser classificada em infecções primárias, onde os microrganismos penetram por meio de cáries profundas, traumatismos dentários ou iatrogenias, gerando um processo de inflamação e subsequente necrose pulpar, ou infecções secundárias/persistentes, que são caracterizadas pela recontaminação do sistema de canais radiculares após o tratamento (Ricucci; Siqueira, 2013; Larsen; Fiehn, 2017).

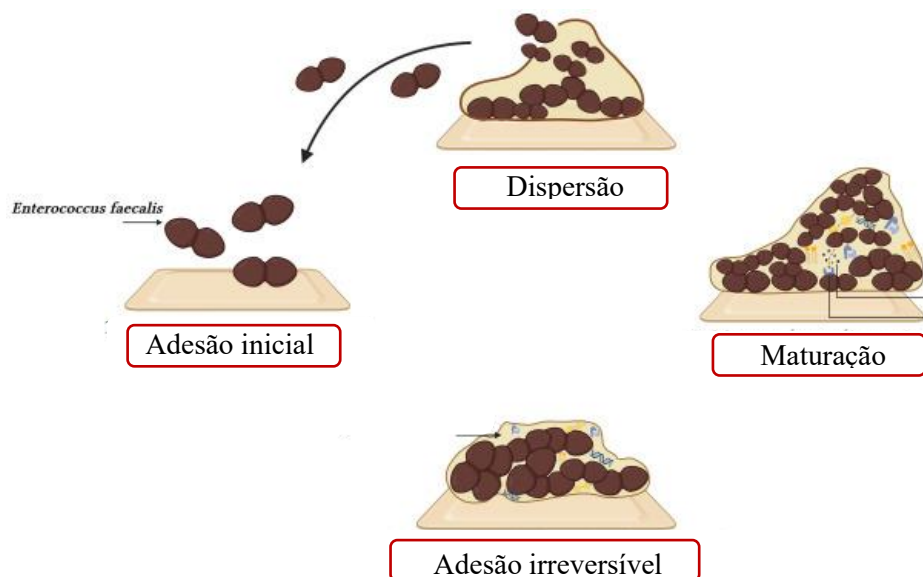
Etiologicamente, essa infecção se correlaciona com a presença de biofilmes, que são comunidades microbianas sésseis que se formam ao longo da parede dos canais e são compostas por múltiplas espécies envoltas de uma matriz extracelular (Mohammadi, *et al.*, 2013). Os microrganismos em estado de biofilme são capazes de sobreviver a condições ambientais e de difícil crescimento, além de apresentar alterações nas taxas de crescimento e expressão genética, tornando-as mais resistentes (Neelakantan *et al.*, 2017).

Essa resistência está associada a presença da matriz extracelular, que é uma estrutura composta por proteínas, polissacarídeos, lipídios e DNA extracelular que fornecem proteção aos estresses ambientais como mudanças de pH, choque osmótico e radiação. Além disso, permite a troca metabólica entre os microrganismos da mesma espécie e de espécies diferentes, permitindo que microrganismos com diferentes condições de crescimento sobrevivam em seus próprios microambientes (Fleming, 2016; Fleming; Rumbaugh, 2017; Neelakantan *et al.*, 2017).

O desenvolvimento dos biofilmes ocorre gradualmente, inicialmente os microrganismos planctônicos se aderem a uma superfície e à medida que essas células se aderem de forma irreversível formam microcolônias e secretam a matriz extracelular, sendo essa fase crucial para a transição de células planctônicas para células sésseis (Verderosa, 2019). Após o desenvolvimento das microcolônias formadas e do estabelecimento de sua arquitetura, o biofilme passara pelo processo de maturação, no qual ocorrerá um aumento notável na estratificação e após atingir o pico de densidade celular, transforma-se em uma comunidade tridimensional, que será regulada pelo *Quorum sensing* (QS), mecanismo químico de comunicação entre os microrganismos presentes no biofilme. Por fim, ocorre a dispersão do biofilme maduro, onde

microcolônias de células da comunidade primária vão sendo liberadas e passam a se aderir em outras superfícies, propagando a infecção, como mostra a figura 1 (Ramakrishnan *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2024).

Figura 1- Fases de formação do biofilme



(Yang *et al.*, 2024)

O biofilme endodôntico é caracterizado pela presença de múltiplas espécies, no qual nas infecções primárias há uma predominância de bactérias anaeróbias, que incluem bactérias Gram-negativas, como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*, *Tannerella forsythia* e *Treponema*, e bactérias Gram-positivas, com predominância das espécies do gênero *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Propionibacterium*, além da presença de leveduras (Narayanan; Vaishnavi, 2010). Enquanto as infecções secundárias há predominância dos microrganismos capazes de sobreviver a condições adversas (Lukic *et al.*, 2020).

Dentre os microrganismos envolvidos na infecção secundária tem-se *Enterococcus faecalis*, que de acordo com alguns estudos é uma das espécies mais predominante no insucesso do tratamento endodôntico (Rôças; Siqueira, 2012; Endo *et al.*, 2013). Trata-se de um coco anaeróbico, Gram-positivo e facultativo que é denominado como patógeno oportunista e apresenta fatores de virulência significativos na infecção (Salem; Tompkins; Cathro, 2022). Dentre os fatores de virulência mais importantes estão substâncias de agregação, adesinas, feromônios, ácido lipoteicóico, superóxido extracelular e enzimas líticas como gelatinase e hialuronidase, que são

responsáveis por ajudar no processo de colonização e competição com outros microrganismos, na resistência aos mecanismos de defesa e na produção de alterações patológicas (Zoletti *et al.*, 2011; Alghamdi; Shakir, 2020).

Além disso, *E. faecalis* apresenta capacidade de sobreviver em condições hostis, como a níveis elevados de pH, no qual atribui-se essa adaptação a utilização da bomba de prótons, que facilita a regulação do equilíbrio citoplasmático, e em ambientes pobres de nutrientes, devido a capacidade de usar componentes presentes na dentina e ligamento periodontal para sua nutrição, facilitando a persistência no sistema de canais radiculares (Yang *et al.*, 2024).

Embora a maioria dos estudos seja voltado para pesquisa de bactérias endodônticas, as leveduras apresentam envolvimento frequente no biofilme endodôntico persistente, com predominância de *C. albicans*, espécie comumente encontrada nas infecções orais e em canais infectados (Li *et al.*, 2023). Esse microrganismo tem a capacidade de colonizar as paredes do canal radicular formando biofilme e possui coadesão com algumas bactérias pioneiras para obter a fixação necessária no dente (Gulati; Nobile, 2016). É importante ressaltar, que assim como *E. faecalis*, *C. albicans* apresenta o mecanismo da bomba de prótons, conseguindo sobreviver a elevados níveis de pH (Yoo *et al.*, 2020).

2.2 Tratamento endodôntico

A infecção microbiana dos canais radiculares acomete a polpa dentária gerando um processo inflamatório, que quando não tratado se espalha por todo sistema de canais radiculares resultando em necrose do tecido pulpar e condições inflamatórias na região periradicular, sendo necessária intervenção (Duncan *et al.*, 2023). A inflamação pulpar em decorrência da infecção dos canais radiculares é denominada pulpíte, enquanto a periodontite apical é a inflamação dos tecidos periradiculares causadas por agentes etiológicos de origem endodôntico (Pitts *et al.*, 2017).

O tratamento endodôntico tem como principal objetivo reduzir a níveis subcríticos, por meio do desbridamento químico-mecânico, os microrganismos envolvidos na infecção dos canais radiculares, sendo um tratamento bem sucedido quando realizado de forma adequada, caso contrário, a infecção pode persistir, ocasionando potenciais complicações (Sebring *et al.*, 2022).

O preparo mecânico dos canais é realizado com limas endodônticas e possibilita a ampliação e modelagem do sistema de canais radiculares, sendo um meio poderoso para remover biofilme (Siqueira Junior *et al.*, 2018). No entanto, limitações, como a complexidade anatômica dos canais, impedem que os instrumentos alcancem todas as paredes do canal e áreas distantes, o que pode implicar na permanência dos microrganismos no interior dos canais radiculares (Arias; Peters, 2022)

Levando em consideração que cerca de 35% das superfícies do canal permanecem sem instrumentação, o uso de substâncias químicas como irrigantes é necessário para alcançar a desinfecção necessária (Cai *et al.*, 2023). Dentre estas, o hipoclorito de sódio (NaOCL) e a clorexidina (CHX) são as mais utilizadas. O NaOCL é uma substância que possui ação antibacteriana dependente do tempo, volume e concentração em que é utilizado e seu mecanismo de ação é baseado em seu elevado pH, que permite alteração na membrana citoplasmática dos microrganismos, além de agir dissolvendo matriz orgânica. Enquanto a CHX apresenta efeito bactericida e bacteriostático a depender das concentrações utilizadas e sua atividade ocorre devido a ligação de suas moléculas catiônicas nas paredes extracelulares dos microrganismos, gerando alteração no equilíbrio osmóticos das células (Mohammadi *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2013).

Apesar das excelentes atividades das substâncias químicas e ampla redução dos microrganismos após o preparo químico-mecânico, estudos mostram que os microrganismos ainda são capazes de sobreviver, podendo ser detectados em cerca de 30% a 60% dos canais após preparo com essas soluções. Acredita-se que a proteção aos estresses externos fornecidos pelo biofilme desempenha um papel importante nessa resistência (Rôças; Siqueira Junior, 2010; Siqueira Junior *et al.*, 2018). Diante disso, uma das estratégias para reduzir a microbiota é complementar o preparo químico-mecânico e potencializar a desinfecção por meio do uso da medicação intracanal (Vera *et al.*, 2012; Paiva *et al.*, 2013).

2.3 Medicação intracanal

A medicação intracanal é uma alternativa para potencializar o processo de desinfecção, buscando tornar inerte o conteúdo restante após o preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares (Pereira *et al.*, 2019). Seu uso está relacionado com melhor reparo dos tecidos perirradiculares e maior chance de sucesso no tratamento de

canais infectados, sendo indicado em casos de infecções mais avançadas ou quando não é possível concluir o tratamento em uma única visita (Zou *et al.*, 2024).

Os medicamentos intracanaais ideais devem apresentar características específicas. Dentre elas ser um agente antimicrobiano eficaz, apresentar a capacidade de neutralizar toxinas, ser permeável e fluido, agir como barreira físico-química dentro do canal radicular e ser de fácil remoção, além disso, deve ser biocompatível com os tecidos apicais, reduzindo a inflamação nos tecidos sem causar irritação e nem interferir no reparo, cicatrização e formação de tecido duro (Zou *et al.*, 2024). Atualmente, existem uma variedade de medicamentos disponíveis, mas ainda não há um que atenda a todos esses requisitos, sendo a escolha dependente do diagnóstico da condição dentária.

Paramonoclorofenol canforado (PMCC), um derivado fenólico, e o tricresol formalina, um formaldeído, são medicamentos intracanal que exercem seus efeitos por meio do contato direto com os microrganismos e pela liberação de vapores, apresentam-se como potentes agentes antimicrobianos, porém além de não cumprirem os requisitos de uma medicação ideal, não apresentam ação seletiva ao conteúdo do canal, tendo o seu uso grande contestações devido a reações de toxicidade (Lopes; Siqueira, 2010).

Clorexidina, um agente antimicrobiano de amplo espectro, apresenta atividade bactericida e bacteriostática, a depender das concentrações que são utilizadas, e é amplamente utilizada na endodontia como irrigante ou medicação intracanal (Gomes *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2017). O seu uso apresenta vantagens devido a sua eficaz atividade antimicrobiana, substantividade e baixa toxicidade, porém é incapaz de neutralizar os restos de tecido pulpar e não atua como barreira física quando utilizada de forma isolada, sendo recomendado o uso por curto período de tempo ou como veículo para o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Gomes *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2016; Marinho *et al.*, 2018).

Hidróxido de cálcio é a medicação mais comumente utilizada na endodontia, além de exercer efeito antimicrobiano, tem a capacidade de dissolução tecidual, indução da formação de tecido mineralizado, biocompatibilidade e atua como barreira física no canal radicular (Mohammadi; Shalavi; Yazdizadeh, 2012). As propriedades antimicrobianas e biológicas dessa medicação derivam de sua dissociação iônica, quando em ambiente aquoso, dos íons Ca^{2+} e OH^- , que proporcionam um ambiente mais alcalino (Kim; Kim, 2014).

A alcalinização do meio é responsável pela atividade antimicrobiana da substância, gerando uma interrupção do metabolismo celular e desnaturação de proteínas estruturais, além disso, a presença de radicais livres originados a partir dos íons hidroxila

causam danos à membrana citoplasmática bacteriana e ao DNA das células (Ordilona-Zapata *et al.*, 2022). Atribui-se também, à alcalinidade do hidróxido de cálcio, a capacidade que o composto tem de formar tecido mineralizado, pois a alteração do pH estimula a fosfatase alcalina e inibe a fosfatase ácida de origem osteoclástica (Lopes; Siqueira, 2010).

A manutenção do pH elevada é de extrema importância para que o hidróxido de cálcio mantenha sua atividade e dentre os fatores que podem influenciar está a substância em que ele é veiculado para o interior dos canais radiculares (Silveira *et al.*, 2011). Os veículos utilizados vão determinar a velocidade do processo de dissociação e são classificados de acordo com suas características físico-químicas, podendo ser hidrossolúvel (aquoso ou viscoso) ou oleoso, onde quanto mais hidrossolúvel mais rápida será a difusão dos íons e o tempo de ação frente aos microrganismos (Zancan *et al.*, 2016; Pedrinha *et al.*, 2022).

Apesar de suas excelentes propriedades, a eficácia do hidróxido de cálcio pode ser limitada, principalmente em infecções persistentes, devido a presença de microrganismos resistentes (Ricucci *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2019). Diante disso, o uso de veículos biologicamente ativo tem sido uma alternativa para potencializar a atividade da medicação, como clorexidina e PMCC, e além destes, tem sido proposto o uso de produtos naturais, uma vez que são potentes agentes antimicrobianos (Barbosa-Ribeiro *et al.*, 2019; Sy *et al.*, 2021).

2.4 Uso de produtos naturais como medicação intracanal

Como visto, todas as medicações apresentam seus próprios benefícios e limitações, diante disso, diversos estudos surgiram com intuito de desenvolver um agente eficaz frente microrganismos resistentes, incluindo o emprego de nanopartículas, fagos, agentes derivados de plantas e probióticos contra biofilmes (Prada *et al.*, 2019).

O uso de produtos naturais como terapia antimicrobiana tem sido crescente na odontologia, esses produtos são conhecidos por sua ampla atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, apresentando grande potencial para facilitar o processo de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (Agrawl *et al.*, 2017; Almadi; Almohaimede, 2018).

A *Curcuma longa* e própolis são produtos naturais que apresentam potencial ação frente ao *E. faecalis*. Vasudeva *et al.* (2017) observaram em seus estudos que própolis e

C. longa apresentaram eficácia antimicrobiana maior que o hidróxido de cálcio nos períodos testados, indo ao encontro de outros achados da literatura (Saha; Nair; Asrani, 2015). Neste mesmo contexto, Patil *et al.* (2022) concluíram que apesar de o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apresentar redução máxima das unidades formadoras de colônia após 14 dias de exposição, o extrato de *C. longa* apresentou maior efetividade nesse mesmo período de tempo.

Aloe vera, também conhecido como babosa, é um composto fitoterápico bastante estudado na endodontia, apresenta atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, além de ser biocompatível e não apresentar toxicidade (Amjed *et al.*, 2017). Diante de suas características, Chasemi *et al.* (2020) avaliaram a sua atividade antibiofilme como medicamento intracanal. O biofilme de *E. faecalis* foi formado nos períodos de 4 e 6 semanas para a realização dos testes e foi possível concluir que o extrato natural de *Aloe vera* apresentou atividade antibiofilme aceitável, assim como os medicamentos padrões, corroborando com outros achados na literatura (Varshini *et al.*, 2019).

Shakya *et al.* (2019) também avaliaram o efeito antimicrobiano de óleos essenciais em diferentes períodos. Os óleos extraídos das raízes de *Chrysopogon zizanioides* e flores de *Matricaria chamomilla*, foram avaliados nos períodos de 1, 7 e 14 dias e comparados com clorexidina e hidróxido de cálcio frente ao biofilme de *E. faecalis*. Os resultados do estudo mostraram que o óleo essencial de *Matricaria chamomilla* é eficaz no tratamento da infecção do canal radicular quando comparado com a clorexidina e o hidróxido de cálcio, enquanto o óleo de *Chrysopogon zizanioides* não sustentou sua atividade por mais tempo, sendo uma desvantagem para o uso como medicação.

Bardwaj *et al.* (2017) avaliaram a atividade de 3 extratos naturais como medicação intracanal: Neem (*Azadirachta indica*), Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) e Guduchi (*Tinospora cordifolia*), em comparação com Clorexidina a 2%. As soluções foram inseridas e mantidas por 48 horas em dentes humanos extraídos, e foi possível concluir ao comparar os três medicamentos fitoterápicos, que o Neem apresentou potente atividade antibacteriana, sendo um agente promissor.

Nisina, um peptídeo antimicrobiano é eficaz contra microrganismos que apresentam resistência a terapias antibióticas convencionais (Shin *et al.*, 2016). Nirmata *et al.* (2022) avaliaram a atividade antimicrobiana desse composto e foi possível observar potente atividade contra *E. faecalis*, sendo semelhante à clorexidina 2%, em

contrapartida, nos estudos de Somanath *et al.* (2015), a nisina apresentou-se mais potente que a clorexidina a 2%.

Levando em consideração que o medicamento intracanal necessita de características específicas e com intuito de potencializar a atividade do $\text{Ca}(\text{OH})_2$, alguns autores sugerem a veiculação do pó de hidróxido de cálcio em compostos naturais. Sofianini *et al.* (2022) compararam o uso da medicação com dois veículos diferentes, própolis e clorexidina 2%, foi visto que a associação com o composto natural apresentou maior eficácia contra *E. faecalis*. Em contrapartida, Raoof *et al.* (2019) concluíram em seus achados que os extratos metanólicos *Myrtus communis* L. e *Eucalyptus galbie* apresentam potente atividade antimicrobiana, porém não apresentaram sinergismo com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, não sendo capazes de eliminar as bactérias quando combinados.

Nesse mesmo contexto, Falcon *et al.* (2022) avaliaram a eficácia de dois óleos essenciais, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*, frente ao biofilme de *E. faecalis* e compararam a sua atividade quando associado ao hidróxido de cálcio. Foi possível concluir que o óleo da canela apresentou potencial terapêutico frente aos microrganismos e que não houve diferença significativa entre o uso do óleo sozinho e associado ao hidróxido de cálcio, mostrando potente atividade do produto natural.

Outros óleos essenciais, como *Rosmarinus officinalis* L., *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium bergamia* e *Copaifera officinalis* também foram testados como veículos para o hidróxido de cálcio, sendo a combinação desses compostos naturais promissora para uso como medicação intracanal devido sua eficácia contra *E. faecalis*. Destes compostos naturais, *Rosmarinus officinalis* L mostrou-se mais eficaz que os demais (Silva *et al.*, 2019).

Cosan *et al.* (2022) também avaliaram o efeito de produtos naturais como veículo para o hidróxido de cálcio. Foram testados os óleos essenciais de *Origanum dubium* e *Mentha spicata* frente ao biofilme de *C. albicans* e *E. faecalis*, e foi possível concluir que os compostos naturais são promissores agentes antimicrobianos, porém apresentam maior eficácia contra fungos. Vale ressaltar que o óleo essencial da *M. spicata* mostrou-se mais potente quando testado como veículo para o hidróxido de cálcio.

Levando em consideração o importante papel que o veículo desempenha nas pastas de medicação intracanal, Magalhães *et al.* (2024) avaliaram a atividade do óleo essencial da *Cyperus articulatus*, popularmente conhecido como priprioca, frente ao biofilme de *E. faecalis*. O produto natural apresentou excelente efeito antimicrobiano, e sua associação com hidróxido de cálcio também mostrou alta capacidade de reduzir o

biofilme maduro de *E. faecalis*, a medicação utilizada como controle, Bio-C Temp, teve um menor efeito antimicrobiano e antibiofilme.

Um outro produto natural promissor é o óleo essencial de *Lippia origanoides*, que apresenta atividade antimicrobiana frente a patógenos resistentes como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e vem sendo amplamente estudado na odontologia (Silva et al., 2024). Além desses, Veras *et al.* (2014) avaliaram a atividade do óleo essencial frente ao biofilme de *E. faecalis*, e foi possível observar ampla atividade, Prado *et al.* (2024) também avaliaram a atividade antimicrobiana de *Lippia origanoides* e concluíram que o produto natural apresenta potente atividade frente ao biofilme de *C. albicans*. Apesar de não ter estudos que avaliem o uso desse produto natural como medicação intracanal, a *Lippia origanoides* é promissora na terapia endodôntica por ter atividade frente a patógenos envolvidos na infecção secundária dos canais radiculares.

Diante das desvantagens encontradas na ação das medicações intracanaís mais comumente utilizadas na endodontia, muitos produtos naturais vêm sendo estudados com essa finalidade. A literatura mostra potencial atividade antimicrobiana/antibiofilme de produtos *naturais* contra patógenos constantemente encontrados na infecção endodôntica, sendo possível concluir que essas substâncias são alternativas potenciais para substituir ou potencializar os agentes químicos utilizados atualmente, porém faz-se necessário mais estudos sobre as propriedades desses produtos naturais e sua atividade *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *L. origanoides* (OELO) sobre biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans* e a sua combinação com hidróxido de cálcio.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair e realizar a caracterização química do óleo essencial de *L. origanoides*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *L. origanoides* sobre cepas de *E. faecalis* e *C. albicans*;
- Determinar a concentração letal mínima (CLM) do óleo essencial de *L. origanoides* sobre cepas de *E. faecalis* e *C. albicans*;
- Avaliar o sinergismo entre o óleo essencial de *L. origanoides* e a clorexidina sobre células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans*;
- Avaliar e comparar, *in vitro*, a atividade do óleo essencial de *L. origanoides* sobre biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* por meio da quantificação da biomassa e viabilidade celular do biofilme;
- Avaliar e comparar, *ex vivo*, a atividade do óleo essencial de *L. origanoides* como veículo para o hidróxido de cálcio sobre biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* em raízes de dentes humano.
- Avaliar a toxicidade do óleo essencial de *L. origanoides*

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação da planta

As folhas da planta *L. origanoides* foram coletadas na região da Pedra da Andorinha, localizada em um distrito de Sobral-Ceará, a 87,8 km da cidade. As folhas coletadas passaram por autenticação e um espécime de comprovante foi depositado no Herbário Professor Francisco José de Abreu Matos (HUVA).

4.2 Extração do óleo essencial

As folhas frescas de *L. origanoides* foram submetidas à hidrodestilação por 2 h em aparelho de Clevenger modificado. Após a extração, o rendimento e a densidade relativa foram medidos utilizando a relação da massa das folhas e da massa do óleo, bem como o volume obtido no final do processo.

4.3 Análise dos constituintes químicos por GC-MS

A análise por GCMS foi realizada em um instrumento Agilent modelo GC-7890B /MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector 150 °C, temperatura da linha de transferência 280 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C.min⁻¹ até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecida pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos), e de dados da literatura (Adams, 2017).

4.4 Cepas e condições de cultura

Foram utilizadas cepas de *E. faecalis*: ATCC® 29212™ e de *C. albicans*: ATCC® 90028™. Os estoques microbianos foram conservados em meio BHI (Brain Heart Infusion – Difco) com glicerol a 20%. Para reativá-las foram realizadas culturas *overnight* para viabilização das cepas microbianas e então inoculados 100 µL de cada cepa em

frascos contendo 10 mL de caldo BHI para *E. faecalis* e 10 ml de caldo Sabouraud para *C. albicans*, em duplicata e incubados à 37° C em aerobiose. Após a reativação, as cepas foram semeadas em ágar BHI e ágar Sabouraud, respectivamente.

Para a confecção do inóculo de *E. faecalis* e *C. albicans*, a pureza da cultura foi verificada e o inóculo padronizado para uma densidade óptica de 0,5 na escala de McFarland, para uma turbidez equivalente a um crescimento de 1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL, respectivamente.

4.5 Preparação da substância teste para ensaios antimicrobianos

O óleo essencial de *L. origanoides* foi devidamente solubilizado em propilenoglicol (PG) à concentração de 10 mg/ml previamente ao uso para os testes, seguindo o protocolo laboratorial adotado. Enquanto a clorexidina foi obtida comercialmente em forma líquida e preparada nas concentrações de 16 µg/mL, conforme a nota do fabricante.

4.6 Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) para cada microrganismo foi determinada como sendo a menor concentração do óleo essencial e da clorexidina que mostre uma inibição completa do crescimento bacteriano visível. Os efeitos antibacterianos foram avaliados através de um teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços.

Primeiro, os poços foram preenchidos com 100µL de meio BHI e em seguida adicionado 100µL do composto a ser testado na primeira linha para realização da diluição seriada, obtendo concentrações que variavam de 2,500 a 19 µg/ml de *L. origanoides* e de 4 a 0,1 µg/ml da clorexidina. Por fim, foi adicionada a suspensão bacteriana de *E. faecalis*, e *C. albicans*, obtendo-se um volume final de 200µL por poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C. Para ambos os testes foi utilizado o meio de cultura com inóculo e meio de cultura para o controle positivo e negativo, respectivamente.

4.7 Obtenção da concentração letal mínima (CLM)

A CLM foi considerada como a menor concentração de compostos capaz de matar os microrganismos nas placas. Para determinar essa concentração, 10µL de cada poço em que o crescimento microbiano não foi visível foi inoculado em placas de *petri* contendo ágar M-*Enterococcus* para avaliar o crescimento de *E. faecalis* e ágar Sabouraud para *C.*

albicans. Foram incubados a 37° C por 24 horas em aerobiose e após esse período foi avaliado se houve ou não crescimento microbiano

4.8 Efeito combinado entre a clorexidina e *Lippia origanoides*

Após a determinação do CIM e CLM, foi realizado a análise combinatória do produto natural com a clorexidina, pela técnica do *Checkerboard*, método usado para determinar a interação dos fármacos através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF). O ICIF é calculado pela adição da Concentração Inibitória Fracional (CIF) para cada um dos compostos ensaiados, sendo definida como a adição dos valores de CIM de cada fármaco na combinação e CIM do mesmo fármaco sozinho (Johnson *et al.*, 2004).

A turbidez das suspensões microbianas foi preparada e ajustada para 0,5 na escala McFarland (1×10^8 UFC/mL para *E. faecalis* e 1×10^6 UFC/mL para *C. albicans*). Nas soluções utilizou-se os produtos testados, nas concentrações dos seus respectivos valores de CIM. Inicialmente 50 µL do meio de cultura foi adicionado a todos os 96 poços da placa de microdiluição, sendo utilizado meio BHI para os testes com *E. faecalis* e meio Sabouraud para *C. albicans*. Foram adicionados então, na primeira coluna, 50 µL do óleo essencial, e em seguida, realizado diluições em série na placa, com a concentração do óleo essencial variando entre CIM e CIM/10. Nas linhas, foram colocados 50 µL da clorexidina, em diferentes concentrações variando entre CIM e CIM/8. Por fim, 100 µL de inóculo foram adicionados a todos os poços. Foi utilizado como controle negativo o meio de cultura com o inóculo. Como controle positivo foram utilizadas as CIM da clorexidina e do óleo essencial separadamente. Os ensaios foram realizados em duplicata. O ICIF foi calculado somando o CIF (produto natural) + CIF (clorexidina). O CIF (produto natural) foi calculado com o CIM combinado/CIM individual do produto natural, enquanto que o CIF (clorexidina) utilizando a CIM combinado/CIM individual da clorexidina. O sinergismo foi definido como o índice de ICIF $< \text{ou} = 0,5$, efeito indiferente com ICIF $> 0,5$ e $< \text{ou} = 4,0$ e antagonismo com ICIF $> 4,0$ (Johnson *et al.*, 2004).

4.9 Avaliação do efeito antibiofilme *in vitro*

4.9.1 Quantificação da biomassa do biofilme

Inicialmente foram realizados os ajustes da densidade de cada inóculo para a formação do biofilme, após o ajuste 100 µL de cada microrganismo foram inoculados em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, a 37 °C. O tempo de incubação para a formação do biofilme multiespécie foi de 21 dias, sendo realizada troca do meio BHI a cada 48 horas.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas 3x com solução salina para remover células residuais e fracamente aderidas. Posteriormente, os poços contendo biofilme foram tratados por 24 horas com os compostos para determinar qual a melhor concentração que inibe o biofilme formado. Foram utilizados os valores de 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM e 20x CIM do óleo essencial e CHX, veículo utilizado como controle.

Para visualizar e quantificar a biomassa de biofilme foi realizado o ensaio de cristal violeta modificado. O conteúdo de cada poço foi coletado e os poços lavados três vezes com 200 µL de solução salina. Após a remoção dos compostos, foi aplicado 200 µL de metanol P.A em cada poço por 10 minutos em temperatura ambiente. Após o período, o metanol foi removido e 200 µL de solução de cristal violeta a 0,1% aplicados a cada poço por 10 minutos em temperatura ambiente, para que os microrganismos aderentes fossem marcados. O excesso de corante foi removido lavando abundantemente com água destilada. As placas foram viradas e secas ao ar, e o corante ligado às células aderentes solubilizado com 200 µL de ácido acético 33% durante 10 minutos. Após esse período, a solução de cada poço foi transferida para uma nova placa e a quantificação da biomassa do biofilme remanescente após o tratamento foi lida em leitor de ELISA com absorbância de 590 nm. Para o controle positivo, utilizou-se caldo de cultura contaminado com o inóculo. Para o controle negativo, foi utilizado caldo de cultura estéril. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9.2 *Teste de viabilidade*

Além da quantificação da biomassa, foi determinado o número de células viáveis presente no biofilme por meio do ensaio de MTT. Para isso, foi realizado a formação do biofilme semelhante ao ensaio anterior e foram adicionados 200 µL dos compostos nas concentrações de 2x, 4x, 10x e 20x a MIC sobre o biofilme formado. Após 24 horas de tratamento, os compostos foram removidos e a placa lavada com PBS por três vezes. Em seguida, foi adicionado o reagente de viabilidade celular brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-

2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, EUA). Foi utilizada uma solução na proporção 75:6; 75 mL de solução de sal de MTT (1 mg/ mL em PBS) e 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha). As placas foram incubadas a 37 °C por 3 horas, protegidas da luz. Após incubação o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após 15 min, foi retirado 100 µL de cada poço e transferido para uma nova placa. A leitura foi realizada no leitor de ELISA com absorvância de 590 nm. Para o controle positivo, utilizou-se caldo de cultura contaminado com o inóculo. Para o controle negativo, foi utilizado caldo de cultura estéril. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9.3 Avaliação da morfologia do biofilme por microscópio óptico de luz

A capacidade que os compostos tiveram de erradicar o biofilme foi observado por microscopia óptica de luz invertida. Para isso, o biofilme multiespécie foi formado sobre lamínulas e as placas foram incubados por 21 dias a 37°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 3x com 5 ml de solução salina para remoção das células planctônicas e foram realizados os mesmos tratamentos descritos anteriormente. Após o tratamento, as lamínulas foram lavadas 3x com 5 ml de solução salina novamente e o biofilme foi fixado com 5 ml de metanol (99%) por 10 min, após esse período, foi removido dos poços e esperado a secagem. Logo após a secagem, as lamínulas foram transferidas para novas placas de petri e coradas com cristal violeta a 1% (M/V) por 10 min para corar as células, depois foram lavadas 3x com água destilada e esperado secar. Após a secagem, as lamínulas foram visualizadas em microscópio óptico de luz invertida em 400x (Fu *et al.*, 2021).

4.10 Avaliação do efeito antibiofilme em raízes de dentes humano

4.10.1 Preparo dos espécimes

Para isso, esse projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa (CEP) e aprovado sob parecer 6.284.116 (ANEXO 1). Foram utilizados 50 raízes de dentes humanos unirradiculares, extraídos por motivos alheios à pesquisa. Após a realização da radiografia periapical, dentes com fraturas radiculares, canais múltiplos, calcificações,

canais radiculares ovais, curvaturas, rizogênese incompleta, reabsorções e com tratamento endodôntico prévio foram excluídos. Em seguida, os dentes selecionados tiveram suas coroas removidas ao nível da junção amelo-dentinária por meio de disco diamantado de 0,3 mm de espessura em máquina de corte a 200 RPM com o objetivo de facilitar o preparo dos canais, com padronização do tamanho da raiz de 15 mm de comprimento. Após o trabalho, a determinação do comprimento foi realizada com limas #15 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça), que foram introduzidas no canal radicular até que sua ponta ultrapassasse o forame apical em 1,0 mm, ficando visível. Em seguida, a lima foi recuada 2,0 mm obtendo-se o comprimento de trabalho (CT). Como forma de padronização dos canais foi realizada uma instrumentação com lima endodôntica R25 reciproc (VDW, Alemanha) com a utilização do motor VDW Silver Reciproc® (VDW, Alemanha) até o CT, associada a irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5%. Para complementar a desinfecção foi removida a *smear layer* com aplicação de EDTA 17% por 3 minutos e irrigação final realizada com soro fisiológico. Todos os procedimentos de irrigação foram realizados com o auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha hipodérmica 0,55 x 20 mm (Becton Dickinson).

As superfícies radiculares foram impermeabilizadas com camada dupla de esmalte de unha vermelho para garantir contaminação dentinária somente por meio do canal principal da raiz, exceto a região cervical de entrada do canal. Cada espécime foi colocado em tubos de eppendorf contendo 1 mL de caldo BHI, e esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm, por 15 min. Por fim, foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas em aerobiose para constatar o não crescimento microbiano.

4.10.2 Protocolo de contaminação dos espécimes

As raízes esterilizadas e inseridas em meio de cultura BHI, foram submetidas a um banho ultrassônico durante 15 minutos para hidratar as amostras e possibilitar a penetração máxima do meio de cultura no canal radicular dos dentes utilizados.

Inicialmente, foi realizado o repique das cepas microbianas 24 horas antes da confecção do inóculo, utilizou-se frascos com ágar BHI para a cultura de *E. faecalis* e frascos com ágar Sabouraud para a cultura de *C. albicans*

No primeiro dia de contaminação foi feito um inóculo padronizado a partir das culturas overnight na concentração de 10^8 UFC/mL para *E. faecalis* e 10^6 UFC/mL para *C. albicans*, utilizando-se a O.D. de 0.1 a 600nm. Estes inóculos foram incubados em

estufa a 37 °C por 7 horas para que o microrganismo estivesse na fase de crescimento exponencial durante a contaminação das amostras (Andrade *et al.*, 2015).

Decorridas essas 7 horas, o meio de cultura BHI utilizado para banho ultrassônico dos espécimes foi removido e descartado e 500µl de cada inóculo na fase exponencial de crescimento foi colocado sobre os espécimes no interior de eppendorfs. Os microtubos contendo os espécimes com o inóculo foram incubados a 37°C por 21 dias, no qual a cada 48 horas foi realizado a troca dos meios.

4.10.3 Protocolo de desinfecção

Após 21 dias de incubação, os espécimes contaminados foram removidos dos tubos e colocados sobre um papel filtro esterilizado em câmara de fluxo laminar. Antes de cada coleta foi inserido no interior do canal uma lima hedstroem #25 (Dentsply) estéril com movimentos de limagem em todo o comprimento de trabalho seguida de inundação do canal radicular com solução salina. Em seguida, foram realizadas as coletas microbianas com pontas de papel absorvente estéril #25. Foram utilizadas três pontas de papel por amostra. Em seguida, as pontas de papel absorvente, individualmente, foram depositadas em eppendorfs com 1 mL de solução salina estéril e foram agitadas por 30 segundos com o objetivo de homogeneizar a suspensão microbiana aderida ao cone de papel. Essa amostra foi denominada "C1"

Após a coleta inicial foram adotados diferentes protocolos de medicação intracanal nos espécimes contaminados, para tanto os dentes foram numerados e aleatoriamente divididos em 3 grupos (n = 15):

Medicação intracanal	Tempo (dias)
Hidróxido de cálcio + propilenoglicol	7
Hidróxido de cálcio + Clorexidina 2% (20 mg/ml)	7
Hidróxido de cálcio + <i>Lippia origanoides</i> (10 mg/ml)	7

Foram utilizadas placas de vidro e espátulas número 24 para manipulação das medicações intracanal, que foram realizadas em proporções pré-determinadas (1:1). A

medicação foi levada ao interior do canal radicular por meio de uma espiral lentulo #25 e o selamento da porção cervical do canal radicular foi realizado com resina, seguindo a sequência de aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products) e aproximadamente 2 mm de resina fotopolimerizável (Filtek Z350). Para o grupo controle (N=5), os dentes contaminados com o biofilme duo-espécie, não foram preenchidos com medicação, apenas salina. Após o selamento da porção cervical, todos os espécimes foram inseridos em frascos contendo 0,3 mL de solução salina, em que apenas o terço apical ficou submerso, e foram incubados em estufa a 37 °C em aerobiose durante o período teste de 7 dias, sendo que a cada 48 horas a salina foi trocada para evitar saturação.

Passado o tempo de incubação, os selamentos com resina de todos os espécimes foram removidos em ambiente asséptico na câmara de fluxo laminar. Para a remoção da medicação intracanal, foi utilizada lima hedstroem #25 sob constante irrigação com solução salina estéril e 5 ml de EDTA 17% em cada dente. Após a remoção, foram realizadas as coletas microbiológicas como descrito anteriormente, sendo denominadas "C2".

4.10.4 Diluição e Plaqueamento das Coletas

Imediatamente após cada coleta, os eppendorfs contendo as amostras contaminadas foram agitados por 30 segundos. A seguir, foram realizadas cinco diluições seriadas em solução salina e, 10 µl de cada diluição foi plaqueado em ágar M-*Enterococcus* e ágar Sabouraud e incubados em estufa a 37 °C em aerobiose. Após 7 dias, as unidades formadoras de colônia (UFC's) foram contadas e foi realizado um somatória das UFC's de *C. albicans* e *E. faecalis* para determinar o total de unidades formadores de colônia do biofilme multiespécie.

4.11 Atividade hemolítica

Foi coletado 10 ml de sangue fresco em tubos de EDTA e centrifugado a 1000 g por 10 min a 4 °C. Após a remoção do plasma, o pellet contendo hemácias foi lavado cinco vezes com PBS e ressuspenso em PBS para obter uma suspensão de 8% (v/v- 1). Cem microlitros de alíquotas desta suspensão foram adicionados a diferentes tubos de microcentrífuga, cada um contendo 100 µl do óleo essencial e CHX diluídos em série

dupla, variando de 0,2 a 200 μM . As concentrações finais foram as seguintes: suspensão de eritrócitos (hemácias) 4% (v/v – 1) e 0,1–100 μM de OELO e CHX. Essas suspensões resultantes foram incubadas com agitação por 1 h a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 1000 g. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços e a liberação de hemoglobina foi medida a 540 nm em um leitor Synergy HT (Biotek). Triton X-100 1% e hemácias não tratadas 4% (v/v – 1) em PBS foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. A porcentagem de hemólise foi calculada como $((\text{OD}_{540 \text{ nm}} (\text{tratado}) - \text{OD}_{540 \text{ nm}} (\text{não tratado})) / (\text{OD}_{540 \text{ nm}} (\text{tratado com TritonX-100}) - \text{Abs}_{540 \text{ nm}} (\text{não tratado}))) \times 100$, e os experimentos foram realizados em triplicata (Cavalcante *et al.*, 2017).

4.12 Citotoxicidade com fibroblastos

O ensaio de citotoxicidade foi realizado conforme orienta a norma ISO 10993-5 (ISO, 2009). Fibroblastos (L929) adquiridos no banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram cultivados em DMEM completo (suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de antibiótico estreptomicina/penicilina) e quando atingiram 80% de confluência foram destacados com tripsina-EDTA e centrifugadas a 200 g por 6 min a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em DMEM novo. A densidade celular foi ajustada para 6×10^4 células/mL, utilizando o método de exclusão com azul de trypan (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e contagem e câmara de Neubauer.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, sendo adicionados de 100 μL /poço (6×10^3 céls. /poço), e cultivadas em estufa sob condições padrão (37 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade) 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e substituído por 100 μL de cada amostra nas concentrações testes (diluições em série), as placas foram incubadas por 24 h. Como controle negativo, utilizou-se células cultivadas em DMEM completo. Além disso, foi utilizado um controle para avaliar a influência do DMSO: o DMSO 2% foi diluído em DMEM (até a diluição 3) e colocado em contato com as células. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico com resazurina, que na presença de células metabolicamente viáveis é convertido em formazan, um composto de coloração roxa/rosa. Após 24h de tratamento foi retirado o conteúdo dos poços e feita a lavagem com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. Em seguida, foram adicionados 120 μL da solução de resazurina 1% preparada em DMEM

completo. As placas foram mantidas sob condições de cultivo padrão por 4 h. Em seguida, foram recolhidos 100 µL de cada poço para uma nova placa e foi realizada a leitura de fluorescência (excitação em 560 nm / emissão 590 nm) em leitora de elisa. A porcentagem de viabilidade celular (VC) foi calculado usando a equação:

$$VC (\%) = \frac{F_{amostra}}{F_{controle}} \times 100$$

Onde *VC* é o percentual de viabilidade celular; *Famostra/controle negativo*: fluorescência.

4.13 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posterior análise estatística no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows). Para a análise de diferenças inter-grupos foi realizado teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O rendimento do óleo essencial de *L. organoides* foi de 2,2%. A análise química por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG-MS) determinou que o constituinte majoritário do óleo essencial é o Timol. Além deste, foi possível identificar a presença de ρ -cimeno, acetato de timol e β -cariofileno (Tabela 1).

Tabela 1- Composição química do óleo essencial de *Lippia organoides*.

Composto	IA _{calc} ¹	IA _{lit} ²	Área relativa (%)
ρ -cymene	1027	1020	1,45
thymol	1298	1289	94,53
thymol acetate	1355	1349	3,02
β -caryophyllene	1420	1417	0,52

¹ Índice Aritmético calculado.

² Índice Aritmético da literatura (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1969).

O óleo essencial de *L. organoides* apresentou atividade antibacteriana contra a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) com o CIM e CLM 1.250 $\mu\text{g/ml}$ e 2.500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, e atividade antifúngica contra a cepa *C. albicans* (ATCC 90028) com CIM de 312 $\mu\text{g/ml}$ e CLM de 625 $\mu\text{g/ml}$. A clorexidina apresentou ampla atividade, com CIM e CLM menor quando comparado ao produto natural para os dois microrganismos em questão (Tabela 2).

Tabela 2- Resultados da CIM e CLM do óleo essencial de *Lippia organoides* e Clorexidina.

Microrganismos	OELO		Clorexidina	
	CIM ¹	CLM ²	CIM ¹	CLM ²
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	1.250 $\mu\text{g/mL}$	2.500 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	312 $\mu\text{g/mL}$	625 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$

¹ Concentração inibitória mínima

² Concentração letal mínima

Ao avaliar o sinergismo entre o óleo essencial e a clorexidina foi possível observar uma redução da MIC dos dois compostos quando associados, porém de acordo com o cálculo do ICIF o efeito sinérgico entre os compostos foi considerado indiferente tanto para a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) como para *C. albicans* (ATCC 90028), sendo ICIF > 0,5 (Tabela 3). Diante desse resultado, optou-se por realizar os testes com os dois compostos separados, utilizando a clorexidina apenas como controle.

Tabela 3- Resultados do sinergismo entre o óleo essencial de *Lippia origanoides* e clorexidina.

Microrganismos	<i>L. origanoides</i>		Clorexidina		ICIF ¹	Efeito
	CIM ² µg/mL (Individual)	CIM ² µg/mL (Combinada)	CIM ² µg/mL (Individual)	CIM ² µg/mL (Combinada)		
<i>E. faecalis</i>	1.250	625	2	0,062	0,53	Indiferente
<i>C. albicans</i>	312	156	2	1	0,75	Indiferente

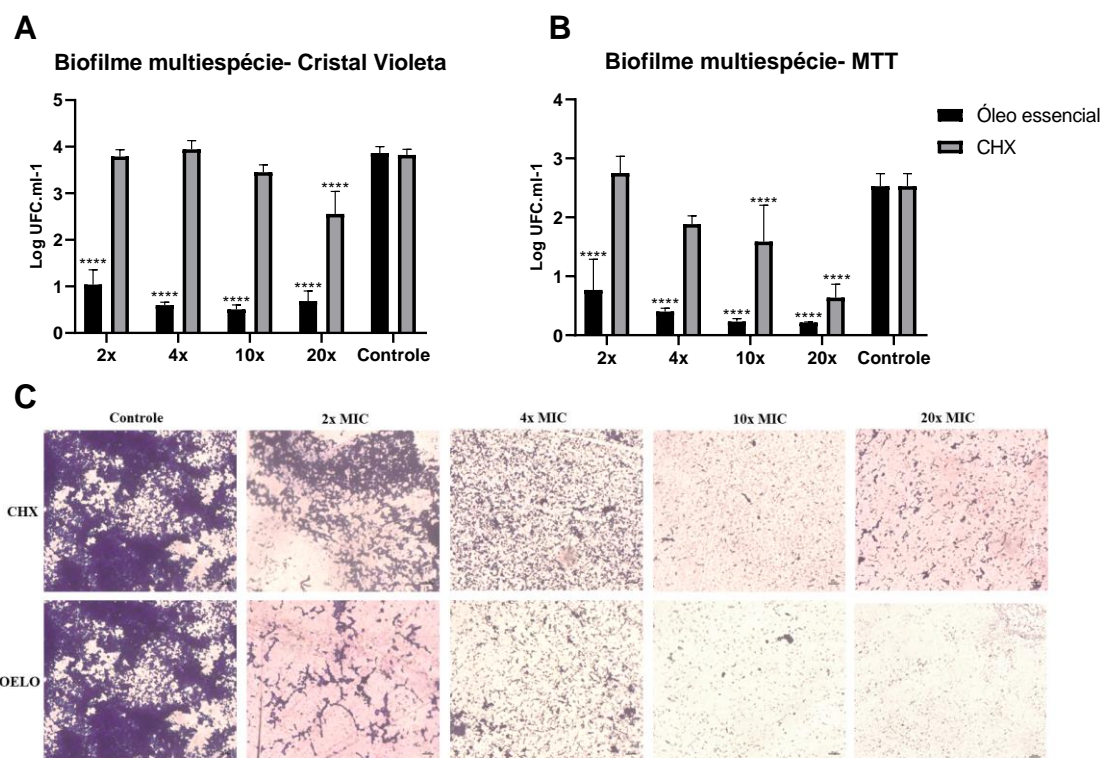
¹ Índice de Concentração Inibitória Fracional

² Concentração inibitória mínima

Nos testes de quantificação da biomassa total, MTT e microscopia foi avaliado a atividade antibiofilme, *in vitro*, do OELO e da CHX contra o biofilme multiespécie de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Foi possível observar uma redução significativa da biomassa do biofilme em todas as concentrações testadas do OELO, onde houve redução de 73%, 85%, 87% e 82% do biofilme tratado nas respectivas concentrações, 2x MIC, 4x MIC, 10x MIC e 20x MIC, em relação ao grupo controle (não tratado). Já a CHX mostrou-se menos efetiva quando comparada ao OELO tanto na redução da biomassa, como na viabilidade celular, havendo redução significativa apenas na concentração de 20x MIC (Figura 2A e 2B).

Na figura 2C, é possível observar por meio das microfotografias do biofilme multiespécie a redução da biomassa e a diferença entre os tratamentos realizados. Conforme mostrado, existe uma maior erradicação do biofilme tratado com o óleo essencial em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com CHX.

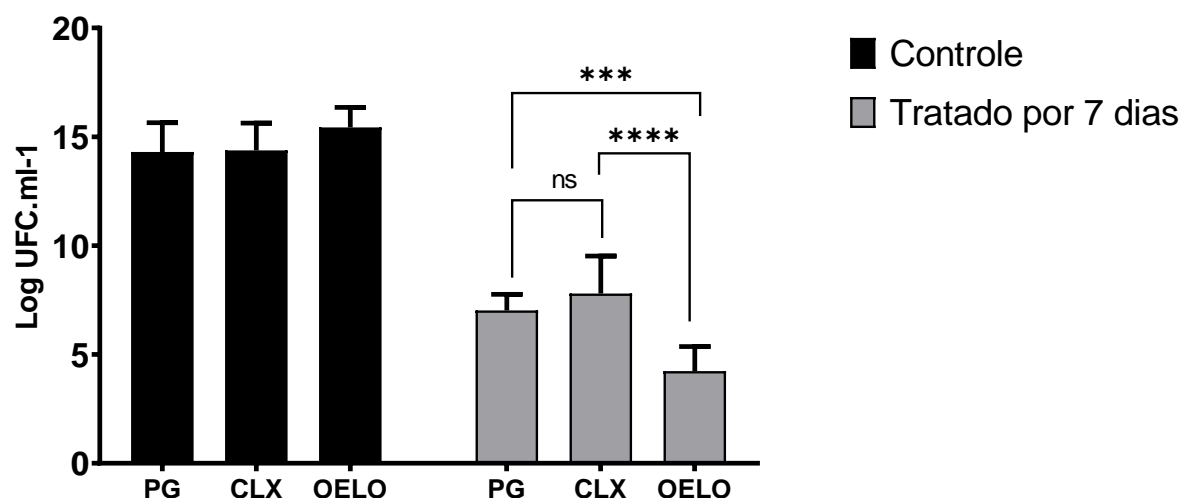
Figura 2- Efeito antibiofilme do óleo essencial de *Lippia origanoides* e CHX frente ao biofilme multiespécie



(A) Avaliação da redução da biomassa do biofilme tratado com óleo essencial e clorexidina, (B) Determinação das células viáveis do biofilme multiespécie após tratamento com óleo essencial e clorexidina, (C) Imagens do microscópio óptico de luz invertida após tratamento com óleo essencial e clorexidina. *São diferenças significativas em relação ao controle

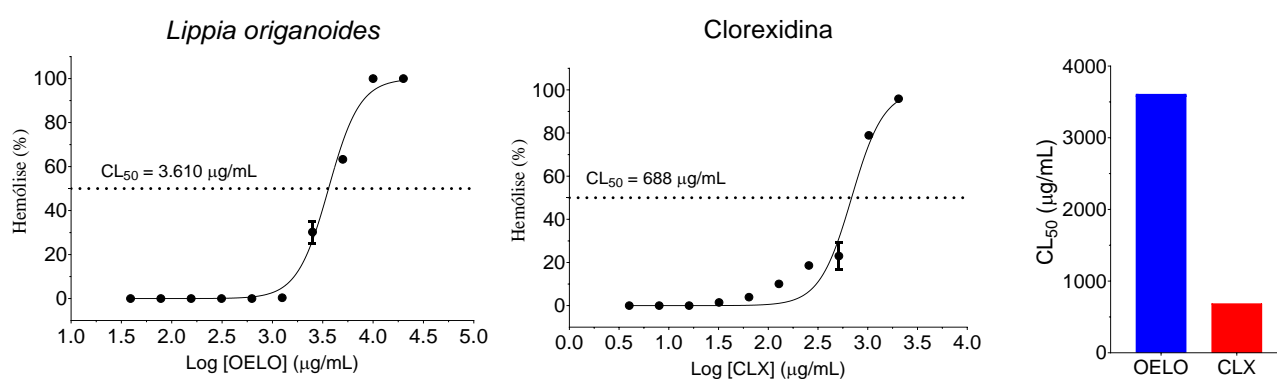
A atividade antibiofilme foi avaliada também, *ex vivo*, utilizando raízes de dentes humanos. Nesse ensaio todos os tratamentos tiveram diferenças estatísticas com relação ao controle não tratado. O Ca (OH)₂ com propilenoglicol (PG) reduziu 51% enquanto quando utilizado CHX e óleo essencial de *L. origanoides* como veículos, houve redução do biofilme em 46% e 73%, respectivamente. Os tratamentos em que foi utilizado o PG e CHX como veículos não apresentaram diferenças significativas entre si. No entanto o tratamento com PG apresentou diferença significativa em relação ao biofilme tratado com uso de OELO como veículo (Figura 3).

Figura 3- Atividade antimicrobiana ex vivo frente ao biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*



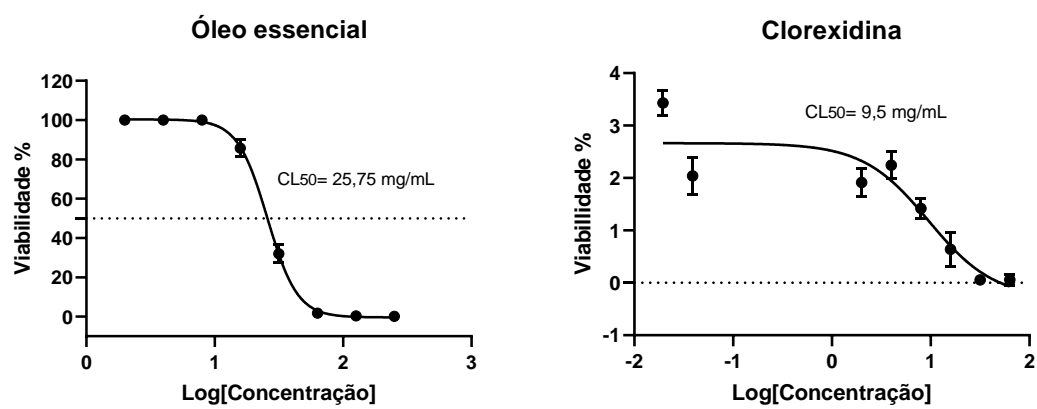
Em relação a atividade hemolítica, foi comparado a atividade do composto natural e CHX (Figura 4). O óleo apresentou CL₅₀ de 3.610 µg/mL, enquanto a clorexidina apresentou CL₅₀ de 688 µg/mL, um valor cinco vezes mais baixo que o CL₅₀ do óleo de *L. origanoides*, apresentando-se, portanto, mais tóxico.

Figura 4- Avaliação da atividade hemolítica do óleo essencial de *Lippia origanoides* e clorexidina



No ensaio com fibroblastos o óleo também se apresentou menos tóxicos que a clorexidina. Na maior concentração avaliada (2,5%), a clorexidina apresentou somente 3,4% de viabilidade. O óleo essencial apresentou concentrações citotóxicas acima de 0,625 mg/mL (Log 1,5), conforme indicado na figura 5.

Figura 5- Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Lippia origanoides* e clorexidina contra fibroblastos.



6. DISCUSSÃO

Embora o hidróxido de cálcio seja a medicação mais utilizada atualmente, ainda há uma preocupação significativa sobre sua efetividade, de acordo com Zancan *et al.* (2019) o hidróxido de cálcio sozinho não é considerado suficiente na eliminação de microrganismos envolvidos nas infecções secundárias ou persistentes do canal radicular, acredita-se que isso ocorra porque esses microrganismos são capazes de tolerar altos níveis de pH, se adaptando a condições severas de sobrevivência (Zancan *et al.*, 2016).

Diante disso, o veículo no qual o hidróxido de cálcio é administrado cumpre um papel crucial, pois além de controlar a velocidade do processo de dissociação iônica de acordo com sua consistência, também pode influir na eficácia antimicrobiana (Barekatain *et al.*, 2012; Nadar *et al.*, 2022). Nesse estudo, avaliamos e comparamos com a clorexidina e o propilenoglicol, veículos comumente utilizados na rotina clínica, a efetividade do óleo essencial de *L. origanoides* como veículo para o hidróxido de cálcio.

O óleo essencial de *L. origanoides* apresenta ampla atividade antimicrobiana relatada na literatura, acredita-se que a atividade biológica do composto está relacionada com sua composição química e interações sinérgicas ou antagônicas entre seus constituintes, que podem apresentar diversidade morfológica e variabilidade a depender de fatores externos como variações climáticas, área de cultivo e qualidade do solo (Vaiciulyte *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2018; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019). A composição química do óleo essencial utilizado nesse estudo teve como constituinte majoritário o Timol (94,53%), um monoterpene conhecido por exercer atividade antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antibiofilme (Jesus *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2017; Santos Filho *et al.*, 2023).

É importante ressaltar que o rendimento do óleo utilizado foi relativamente alto quando comparado a outros estudos com essa planta aromática, sendo um fator significativo para as aplicações comerciais e industriais da planta (Teles *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2024). De acordo com a literatura o rendimento do óleo essencial de *L. origanoides* pode variar entre 1,3% a 2,3%, podendo ter influência das condições de cultivo, radiação solar e temperatura (Ribeiro *et al.*, 2014; Sarrazin *et al.*, 2015).

Levando em consideração a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides*, nesse estudo foi avaliado a atividade do composto natural contra o biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, ambos microrganismos oportunistas e que estão

frequentemente envolvidos com a falha do tratamento endodôntico (Veras *et al.*, 2014; Cosan *et al.*, 2022).

Foi possível observar em nosso estudo que o óleo essencial de *L. origanoides* mostrou-se mais efetivo que a clorexidina em todas as concentrações testadas frente ao biofilme maduro. Acredita-se que a atividade do óleo essencial esteja associada com o alto nível de timol em sua composição, embora o mecanismo de ação do monoterpene não seja completamente elucidado na literatura, um dos possíveis modos de agir do composto é por meio de uma ruptura da membrana celular, levando ao aumento da permeabilidade e subsequente morte celular (Cacéres *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2021).

Diante da ampla atividade antimicrobiana do composto natural frente a microrganismos envolvidos na infecção endodôntica, foi avaliado a sua ação associado ao hidróxido de cálcio em comparação com propilenoglicol e CHX, veículos já utilizados rotineiramente. É importante destacar que para esse teste foram utilizados dentes humanos naturais como espécimes e a eficácia da medicação também foi avaliada frente a um biofilme multiespécie maduro, proporcionando assim uma melhor simulação do cenário clínico e maior precisão nos resultados.

O propilenoglicol é utilizado como veículo em diversos produtos, sua aplicação com hidróxido de cálcio permite a dissociação lenta dos íons cálcio e hidroxila, favorecendo o processo quando comparado a veículos aquoso, apesar dessas vantagens, o PG é um veículo inerte, ou seja, não apresenta atividade biológica (Kruger *et al.*, 2022). Em nosso estudo foi possível observar uma redução de 51% do biofilme multiespécie tratado com hidróxido de cálcio e propilenoglicol após 7 dias de exposição, tempo necessário, de acordo com os estudos, para o hidróxido de cálcio alterar o pH do meio a um nível que muitos microrganismos não sobrevivam (Fulzele *et al.*, 2011).

Em relação a eficácia da CHX, apesar de sua substantividade e amplo espectro de atividade, não houve diferença significativa ao comparar sua efetividade com o propilenoglicol como veículos para o hidróxido de cálcio. Assim como em nossos estudos, Zancan *et al.* (2019) também avaliaram a atividade da CHX como medicação intracanal no período de 7 dias e viram que a medicação apresentou limitações frente ao biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans*. De acordo com os resultados de Khan *et al.* (2022), diversos fatores podem influenciar na efetividade da CHX frente ao biofilme, desde as concentrações e formas físicas da CHX, períodos de experimentos, cepas e concentrações até aos métodos de inoculação bacteriana, podendo ser uma limitação dos estudos (Khan *et al.*, 2022).

Ao analisar a atividade do hidróxido de cálcio veiculado com o produto natural, o presente estudo mostrou que o óleo essencial apresentou maior efetividade quando comparado com os outros dois veículos, sendo uma boa alternativa terapêutica por ampliar o espectro de ação antimicrobiana da formulação. Esses resultados estão de acordo com outros achados na literatura, onde o OELO mostra-se promissor na terapia endodôntica (Veras *et al.*, 2014; Santana Neto *et al.*, 2020).

Sofianini *et al.* (2022) também compararam o uso do hidróxido de cálcio com dois veículos diferentes, própolis e clorexidina 2%, foi visto que a associação com o composto natural apresentou maior eficácia contra *E. faecalis*. Além deste, óleos essenciais como *Rosmarinus officinalis* L., *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium bergamia*, *Copaifera officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinal* também mostraram-se promissor frente ao *E. faecalis* (Silva *et al.*, 2019; Cosan *et al.*, 2022; Falcon *et al.*, 2022). Porém, nenhum dos estudos dispostos na literatura avaliaram o efeito dos produtos naturais frente ao biofilme multiespécie de 21 dias, sendo uma vantagem do nosso estudo.

Além da atividade antimicrobiana, a medicação intracanal deve apresentar outras propriedades, como alta alcalinidade, capacidade de dissolução de tecidos, capacidade de neutralizar endotoxinas e baixa toxicidade aos tecidos adjacentes (Ordinola-Zapata *et al.*, 2022). Diante disso, a citotoxicidade dos compostos testados como veículos para o hidróxido de cálcio foi testada contra eritrócitos e fibroblastos. A partir da avaliação da atividade hemolítica, que é a capacidade que os compostos tem de gerar hemólise das células presente no sangue, foi possível observar que a clorexidina se mostrou 5x mais tóxica do que o composto natural (Figura 4). O óleo essencial apresentou CL₅₀ de 3.610 µg/mL, e de acordo com o índice de toxicidade de Meyer, óleos essenciais de plantas com valor de CL₅₀ > 1000 µg mL⁻¹ não são considerados citotóxicos, apresentando-se como uma boa opção de veículo para hidróxido de cálcio (Meyer *et al.*, 1982). Perfil semelhante de citotoxicidade foi encontrado no ensaio com fibroblastos (Figura 5). Segundo a ISO 10993-5, percentual de viabilidade celular igual ou superior a 70% indica não-citotoxicidade. Com base nesse critério, o óleo se apresentou tóxico em concentrações acima de 0,625 mg/mL, enquanto a clorexidina, quando utilizada como veículo, apresentou-se tóxica em todas as concentrações testadas (2,5mg/mL a 0,015 mg/mL), apresentando somente cerca de 3,4% de células viáveis na menor concentração.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse estudo é possível concluir que o óleo essencial de *L. origanoides*, como veículo para o hidróxido de cálcio, exerceu bons efeitos antibiofilme frente ao biofilme maduro de *E. faecalis* e *C. albicans*. Diante disso, o produto natural em questão é um agente promissor no processo de desinfecção do sistema de canais radiculares, portanto faz-se necessário mais estudos com sua aplicação *in vivo* para demonstrar sua eficácia antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI F, SHAKIR M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. **Cureus**, v.12, n.3, e7257, 2020
- ALMEIDA M.C. *et al.* Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). **BMC Research Notes**. v. 11, n.1, p.725, 2018.
- AL-SABAWI N. A, MOHAMMAD F. A, SHEHAB N. F. Residual antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel as an intracanal medicament. **Journal of Dental Research**, v. 31, n. 6, p. 846-851, 2020.
- ANDRADE F. B. *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. **Journal of Applied Oral Science**. v. 23, n. 6, p.591-8, 2015.
- BARBOSA R. *et al.* Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.50, n.12, e.6351, 2017
- BAREKATAIN B. *et al.* The effect of calcium hydroxide placement on pH and calcium concentration in periapical environment: an “*in vitro*” study. **Indian Journal of Dental Research**. v.23, n.2, p.226-9, 2012
- BHARDWAJ A. *et al.* How efficacious are Neem, Tulsi, Guduchi extracts and chlorhexidine as intracanal disinfectants? A comparative ex vivo study. **Ayu**, v. 38, n. 1-2, p.70-75, 2017.
- CABALLERO-GALLARDO K. *et al.* Chemical Composition, Repellent Action, and Toxicity of Essential Oils from *Lippia origanoide*, *Lippia alba* Chemotypes, and *Pogostemon cablin* on Adults of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Insects**. v.14, n.1, p.41., 2022
- CÁCERES M. *et al.* Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. **Antibiotics** (Basel). v.9, n.4, p.147, 2020.
- CAVALCANTE C. *et al.* Anti-fungal activity of Ctn [15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. **Journal Antibiotics** (Tokyo), v.70, n. 3, p. 231-237, 2017.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10, 2015.
- CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M27-A3, 2008.
- COSAN G. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Calcium Hydroxide Mixed with Two Different Essential Oils. **Molecules**, v. 27, n. 9, p.2635, 2022.

FONTENELLE R. O *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia organoides* Cham. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 59, n.5, p.934-40, 2007.

FREIRES I. A *et al.* Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, v.20, n.4, p. 7329-58, 2015.

FULZELE P. *et al.* Evaluation of calcium ion, hydroxyl ion release and pH levels in various calcium hydroxide based intracanal medicaments: An “*in vitro*” study. **Contemporary Clinical Dentistry**. v.2, n.4, p.291-5, 2011.

GHATOLE K. *et al.* Enhancing the antibacterial activity of the gold standard intracanal medicament with incorporation of silver zeolite: An in vitro study. **Journal of International Society of Preventive & Community Dental**, v.6, n.1, p.75-9, 2016.

GOMES B. P *et al.* Chlorhexidine in endodontics. **Brazilian Dental Journal**. v. 24, n. 2, p. 89-102, 2013.

GULATI M, NOBILE C.J. *C. albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v.18, n.5, p.310-21, 2016.

HARSHITHA V.S, RANJINI M.A, NADIG R.R. Antibacterial efficacy of nisin, calcium hydroxide, and triple antibiotic paste in combination with chitosan as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis* - An *in vitro* study. **Journal of Conservative Dental**. v.25, n.5, p.504-509, 2022.

IBRAHIM A.M, ZAKHARY S.Y, AMIN S.A.W. Calcium hydroxide intracanal medication effects on pain and flare-up: a systematic review and meta-analysis. **Restorative Dentistry Endodontics**. v.45, n.3, e26, 2020.

JESUS F. P. *et al.* In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical Mycology**. v.25, n.2, e.89-93, 2015.

JOHNSON, M. D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KHAN A. *et al.* Effectiveness of polyhexamethylene biguanide, chlorhexidine, and calcium hydroxide intracanal medicament against intraradicular mature polymicrobial biofilm: A microbiological study. **Journal of Conservative Dental**, v.25, n.5, p.536-540, 2022.

KRÜGER H. C. *et al.* Antimicrobial action, cytotoxicity, calcium ion release, and pH variation of a calcium hydroxide-based paste associated with *Myracrodruon urundeuva* Allemão extract. **Australian Endodontics Journal**. v.48, n.1, p.170-178, 2022.

KUMAR G. *et al.* Can Probiotics Emerge as Effective Therapeutic Agents in Apical Periodontitis? A Review. **Probiotics Antimicrobianal Proteins**, 2021

LOPES, H; SIQUEIRA JR, J.F. **Endodontia: biologia e técnica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1801 p.

MARTÍNEZ A. *et al.* Effect of Essential Oils on Growth Inhibition, Biofilm Formation and Membrane Integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics** (Basel). v.10, n.12, p.1474, 2021.

MELO A.R.B *et al.* *Lippia origanoides* and *Lippia origanoides* essential oils affect the viability, motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Micron**, 2020.

MOHAMMADI Z, DUMMER PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **Internatinal of Endodontics Journal**, v.44, n.8, p.697-730, 2011.

NADAR A. *et al.* A comparative evaluation of calcium ion release and pH change using calcium hydroxide nanoparticles as intracanal medicament with different vehicles - An *in vitro* study. **Journal Conservative Dental**. v.26, n.1, p.47-51, 2023.

NAIR P.N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International of Endodontics Journal**, v.39, n.4, p.249-81, 2006.

NARAYANAN L.L, VAISHNAVI C. Endodontic microbiology. **Jounal of Conservative Dental**, v.13, n.4, p.233-9, 2010.

NEELAKANTAN P. *et al.* Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. **International of Journal Molecules Science**, v.18, n.8, p.1748, 2017.

NUNES B. S. *et al.* Chitosan-Based Biomaterial, Calcium Hydroxide and Chlorhexidine for Potential Use as Intracanal Medication. **Materials** (Basel). v.14, n.3, p.488, 2021.

ORDINOLA-ZAPATA R. *et al.* Present status and future directions of intracanal medicaments. **International of Endodontics Journal**. v. 55, n. 3, p.613-636, 2022.

PEDRINHA V.F. *et al.* The Vehicles of Calcium Hydroxide Pastes Interfere with Antimicrobial Effect, Biofilm Polysaccharidic Matrix, and Pastes' Physicochemical Properties. **Biomedicines**, v.10, n.12, p.3123, 2022.

PIERCE, C.G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**. v.3, p. 1494–1500, 2008.

POLYZOS N. *et al.* Quality of Root Canal Fillings Performed by Undergraduate Students and the Related Factors on the Treatment Outcome: A 2- to 5-Year Follow-Up. **European endodontic jornal**. v. 3, n. 3, p. 179-185, 2018.

PRADA I. *et al.* Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Oral Medicine and Oral Pathology and bucal cirurgy**. v.24, n.3, e364-e372, 2019.

QAMAR S.; JAYANNA R.; AHUJA VR. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, chlorhexidine, and triple antibiotic paste in different combination forms as intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: An *In Vivo* Randomized Clinical Trial. **International Journal Clinical Pediatric Dental**. v.16, n. 3, p.448-452, 2023.

RATIH D.N, MULYAWATI E., FAJRIANTI H. Antibacterial efficacy, calcium ion release, and pH using calcium hydroxide with three vehicles. **Journal of Conservaty Dental**, v.25, n.5, p.515-520, 2022.

- RIBEIRO A. F. *et al.* Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology** . v.55, p.249–259, 2014.
- RIBEIRO F. P. *et al.* Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia organoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. **Evid Based Complement Alternat Med**. v.19, 2021.
- RUIZ-DURAN J. *et al.* Antifungal and Antibiofilm Activity of Colombian Essential Oils against Different *Candida* Strains. **Antibiotics** (Basel). v.12, n.4, p.668, 2023.
- SANTANA NETO M. C. *et al.* Development of Chlorhexidine Digluconate and *Lippia sidoides* Essential Oil Loaded in Microemulsion for Disinfection of Dental Root Canals: Substantivity Profile and Antimicrobial Activity. **AAPS PharmSciTech**. v.21, n.8, p.302, 2020.
- SANTOS FILHO L. G. *et al.* Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia organoides*. **An Acad Bras Cienc**. v.95, n.1, e.20220359, 2023.
- SARRAZIN S. L. *et al.* Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides* kunth. **Molecules**. v.20, n.2, p.1860-71, 2015.
- SHAKYA V.K. *et al.* A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with calcium hydroxide and chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis* in *ex vivo* root canal models. **Journal of Conservative Dental**, v.22, n.1, p.34-39, 2019.
- SILVA A. T. *et al.* Bactericidal and Synergistic Effects of *Lippia organoides* Essential Oil and Its Main Constituents against Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. **ACS Omega**. v.9, n.43, p. 43927-43939, 2024.
- SIQUEIRA JR J.F, LOPES H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International of Endodontics Journal**, v.32, n.5, p.361-9, 1999.
- SIQUEIRA JR J.F, RÔÇAS I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery and Oral Medicines and Oral Pathology and Oral Radiology Endodontics**, v.97, n.1, p.85-94, 2004.
- SIQUEIRA JR J.F, UZEDA M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **Journal of Endodontics**, v.23, n.3, p.167-9, 1997.
- SY K. *et al.* How Adding Chlorhexidine or Metallic Nanoparticles Affects the Antimicrobial Performance of Calcium Hydroxide Paste as an Intracanal Medication: An In Vitro Study. **Antibiotics**, v.10, n.11, p.1352, 2021.
- TELES S. *et al.* Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia organoides* H.B.K. **Industrial Crops and Products**. v.59, p.169–176, 2014.

VALDIVIESO-UGARTE M. *et al.* Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. **Nutrients**. v.11, n.11, p.2786, 2019.

VAN DEN DOOL H, DEC K. P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatography**, v. 11, p. 463 – 471, 1963.

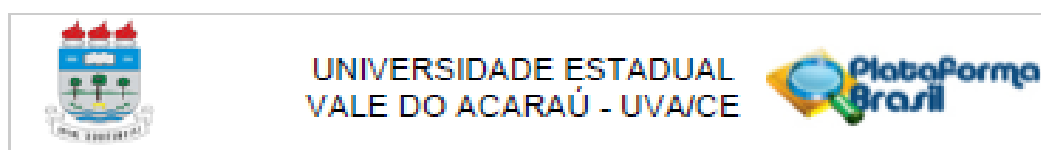
VERAS H. N. *et al.* Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. **ScientificWorldJournal**. v.6, 2014.

YOO Y.J *et al.* *C. albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. **Microorganisms**, v.8, n.9, p.1300, 2020.

ZANCAN R. F. *et al.* Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. **Microscopy Research and Technique**. v.82, n.5, p.494-500, 2019.

ZANCAN R. F. *et al.* Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medicament. **Journal of Endodontics**. v.42, n.12, p.1822 – 1828, 2016.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DO USO DO ÓLEO ESSENCIAL DA LIPPIA ORIGANOIDES COMO VEÍCULO PARA MEDICAÇÃO INTRACANAL CONTRA O BIOFILME DE CANDIDA ALBICANS E ENTEROCOCCUS FAECALIS

Pesquisador: Marcelle Magalhães

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71416923.2.0000.5053

Instituição Proponente: Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.284.116

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como objetivo avaliar, in vitro, o potencial antimicrobiano do óleo essencial da *Lippia origanoides* quando associado ao pó de hidróxido de cálcio sobre o biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Serão realizadas coletas, extração e análise química dos constituintes do óleo essencial, seguido de testes de atividade antimicrobiana para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), concentração letal mínima (CLM), testes de atividade antibiofilme em placa e em raízes de dentes humano. A CIM será definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir 100% o crescimento microbiano visível por meio de testes de microdiluição em placas de poliestireno. Para a CLM, 100µl de cada poço, em que nenhum crescimento visível foi detectado, será inoculado em placas de petri contendo agar BHI e incubadas a 37° C por 24 horas. Será considerado como CLM a menor concentração dos extratos capaz de matar os microorganismos. A atividade antibiofilme em placa será realizada através do ensaio cristal violeta para avaliar a concentração do óleo essencial mais efetiva na biomassa do biofilme multiespécie.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar, in vitro, o potencial antimicrobiano do óleo essencial da *Lippia origanoides* quando

Endereço: Av Comandante Maurocílio Rocha Ponte, 150
 Bairro: Derby CEP: 62.041-040
 UF: CE Município: SOBRAL
 Telefone: (88)3877-4255 Fax: (88)3877-4242 E-mail: cep_uva@uvanet.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



Continuação do Parecer: 8.204.118

associado ao hidróxido de cálcio sobre um biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans*

Objetivo Secundário:

Coletar, extrair e realizar a caracterização química do óleo essencial da *Lippia origanoides*; - Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo da *Lippia origanoides* sobre duas cepas, *E. faecalis* e *C. albicans*; - Determinar a concentração letal mínima (CLM) do óleo da *Lippia origanoides* sobre duas cepas, *E. faecalis* e *C. albicans*; - Determinar o melhor tempo de formação do biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* em placas de poliestireno; - Avaliar, *in vitro*, a atividade antibiofilme do óleo da *Lippia origanoides* sobre biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* por meio do método de ensaio cristal violeta e da viabilidade celular; - Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do óleo da *Lippia origanoides* quando associado ao pó de hidróxido de cálcio sobre biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* em raízes de dente humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos para o doador, pois sua identidade e integridade será preservada e os dentes a serem utilizados deveram ser extraídos com a devida indicação clínica.

Benefícios:

A partir desse estudo, esse doador estará contribuindo para pesquisa básica de produtos que possam ter atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podendo ser utilizados como modelos para desenvolvimento de fármacos antimicrobianos que serão úteis como opção terapêutica no tratamento endodôntico

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Importante com potencial gerador de novos medicamentos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Não se aplicam

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado por este comitê.

Endereço: Av. Comandante Maurício Rocha Pente, 150
Bairro: Derby CEP: 62.041-040
UF: CE Município: SOBRAL
Telefone: (88)3877-4255 Fax: (88)3877-4242 E-mail: cep_uva@uvanet.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



Continuação do Parecer: 6.354.118

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_2174068.pdf	29/08/2023 16:36:20		Aceito
Outros	FIEL_DEPOSITARIO2.pdf	29/08/2023 16:36:06	Marcelle Magalhães	Aceito
Outros	CARTA_de_anuência.pdf	29/08/2023 16:33:27	Marcelle Magalhães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/07/2023 09:46:35	Marcelle Magalhães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	INSENCOO_DE_TCLE.pdf	12/07/2023 11:28:27	Marcelle Magalhães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_comite_MARCELLE.pdf	12/07/2023 11:27:40	Marcelle Magalhães	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	12/07/2023 11:26:40	Marcelle Magalhães	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	12/07/2023 11:25:37	Marcelle Magalhães	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	12/07/2023 11:25:14	Marcelle Magalhães	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SOBRAL, 05 de Setembro de 2023

Assinado por:
Erolde Leite de Pinho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Comandante Maurocílio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby CEP: 62.041-040
UF: CE Município: SOBRAL
Telefone: (88)3877-4255 Fax: (88)3877-4242 E-mail: cep_uva@uvanet.br

ANEXO 2

USO DE PRODUTOS NATURAIS COMO UMA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NA DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

Marcelle Melo Magalhães; Francisca Livia Viana Parente; Francisco Cesar Barroso Barbosa; Francisca Lidiane Linhares Aguiar; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle

RESUMO

O principal objetivo do tratamento endodôntico é reduzir substancialmente os microrganismos do interior do sistema de canais radiculares por meio da ação mecânica dos instrumentos e do preparo químico com irrigantes e medicação intracanal. As soluções utilizadas no processo de desinfecção apresentam algumas propriedades indesejáveis, e diante disso, a busca por novos agentes que possam suprir tais limitações é incessante. O uso de produtos naturais com essa finalidade vem sendo cada vez mais estudado devido as vantagens que estes apresentam, como ampla atividade antimicrobiana e biocompatibilidade. Com base nessas considerações foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o uso de produtos naturais com potencial atividade antimicrobiana na desinfecção do sistema de canais radiculares. Foram utilizados artigos da base de dados Pubmed, Scopus e Web of Science, dos últimos 10 anos, com as palavras-chave: “*Enterococcus faecalis*”, “Natural products”, “Endodontics”, “Natural irrigants”, e “herbal intracanal medicaments”, utilizou-se como critério de exclusão estudos de revisão e que abrangiam outras áreas da odontologia. A maioria dos estudos selecionados para essa pesquisa relataram potencial atividade antimicrobiana dos produtos naturais frente aos patógenos endodônticos resistente, sendo potenciais alternativas no processo de desinfecção durante o tratamento endodôntico. Portanto, produtos naturais podem ser considerados potentes opções de irrigantes e medicamentos intracanal, devido a ampla atividade antimicrobiana que apresentam, além da baixa citotoxicidade e biocompatibilidade.

INTRODUÇÃO

As infecções endodônticas são caracterizadas pela presença de diferentes microrganismos com maior predominância de bactérias anaeróbicas, além disso, é relatado na literatura a presença de fungos leveduriformes, como a *Candida albicans* (KUMAR *et al.*, 2015; SIQUEIRA JR; RÔNCAS, 2013). Esses microrganismos podem ser encontrados em forma planctônica no lúmen do canal ou organizados em biofilmes, que são comunidades microbianas que se aderem às paredes do canal e são protegidas por uma matriz extracelular, o que a torna mais resistente a terapias antimicrobianas (HADAL *et al.*, 2016).

O principal objetivo do tratamento endodôntico é reduzir substancialmente os microrganismos presentes no interior do sistema de canais radiculares por meio da limpeza, desinfecção e preenchimento dos canais infectados (MERGONI *et al.*, 2022). As medidas de limpeza e desinfecção, que incluem o preparo químico-mecânico e as medicações intracanal, são considerados uma das fases mais importante do tratamento, pois possibilitam a remoção de detritos infectados, bactérias patogênicas e tecido orgânico do interior dos canais radiculares, eliminando as principais causas da infecção (SIQUEIRA JR *et al.*, 2018).

A utilização de agentes antimicrobianos durante o preparo químico é crucial para o sucesso do tratamento, tendo em vista que é a única maneira de penetrar nas áreas de difícil acesso do sistema de canais radiculares que não foram tocadas pela instrumentação mecânica (PEREIRA *et al.*, 2021). Além do preparo químico, o uso de soluções com atividade antimicrobiana é preconizado entre sessões com a medicação intracanal, pois em alguns casos o preparo químico-mecânico não é o suficiente para obter a antissepsia necessária para o sucesso do tratamento (ZANCAN *et al.*, 2016).

Apesar das excelentes propriedades das soluções já utilizadas, alguns estudos mostram uma ação limitada desses agentes devido a propriedades indesejáveis que apresentam, como alta citotoxicidade, cheiro e sabor desagradável e baixa compatibilidade com outras soluções, sendo considerado um desafio o equilíbrio entre a eficácia e a segurança desses compostos (HAAPASALO *et al.*, 2014). Diante disso, a busca por novos agentes que apresentem boa atividade antimicrobiana e efeito tóxicos mínimos aos tecidos periapicais tem sido incessante a fim de melhorar o prognóstico endodôntico (ALMADI; ALMOHAIMEDE, 2018).

Nas últimas décadas o uso de plantas medicinais como terapia antimicrobiana tem sido crescente na Odontologia. Os produtos naturais são conhecidos por sua ampla atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedades anti-inflamatórias e

antioxidantes, apresentando grande potencial para facilitar o processo de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (AGRAWL *et al.*, 2017; ALMADI; ALMOHAIMEDE, 2018).

Levando em consideração a sua origem natural, fácil disponibilidade, eficácia e segurança, o objetivo desta revisão é avaliar na literatura o uso de produtos naturais como agentes antimicrobianos durante o preparo químico e a medicação intracanal na terapia endodôntica.

METODOLOGIA

Foi realizado uma revisão bibliográfica utilizando as bases de dados Pubmed, Scopus e Web of Science com a estratégia de busca baseada nas seguintes palavras-chave: “*Enterococcus faecalis*”, “Natural products”, “Endodontics”, “Natural irrigants”, e “herbal intracanal medicaments”, unidos por operadores booleanos AND e OR, sendo o campo de busca limitado no título e no resumo.

Como critério de inclusão foram considerados estudos dos últimos 10 anos, na língua inglesa, que abordassem a aplicação de produtos naturais como irrigantes ou medicamento intracanal na terapia endodôntica. Foram excluídos estudos de revisão e que abrangiam outras áreas da odontologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infecção endodôntica

Uma vez que o canal radicular é exposto a cavidade oral por meio de microrganismos e seus subprodutos, ocorre uma inflamação pulpar seguida da infecção do canal radicular e necrose, sendo denominada como infecção endodôntica primária (NEELAKANTAN *et al.*, 2017). Nos casos em que durante o tratamento da infecção endodôntica novos microrganismos penetram nos canais radiculares ou resistem ao tratamento a infecção passa a ser secundária ou persistente (LOPES; SIQUEIRA JR, 2015; NEELAKANTAN *et al.*, 2017).

A infecção endodôntica é caracterizada por apresentar caráter polimicrobiano, sendo predominante a presença de *Bacterioides*, *Phophyronoma*, *Prevotella*, *Streptococcus* e *Bacillus* (NEELAKANTAN *et al.*, 2017; TAWFIK *et al.*, 2018). Em casos de infecções secundárias, é relatado a presença de espécies *P. gingivalis*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Propionibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis*, além da presença de fungos, como *Candida albicans* (ZAKARIA, *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; ALGHAMDI; ALHADDAD; ABUZINADAH, 2020).

Alguns estudos destacam *E. faecalis* como a principal bactéria associada ao insucesso do tratamento endodôntico (SIQUEIRA JR; RÔNÇAS, 2022). Acredita-se que isso ocorra devido aos mecanismos de sobrevivência que ela apresenta, dentre estes tem a capacidade de invadir túbulos dentinários, não necessita de suporte para sua sobrevivência, sobrevive a elevados níveis de pH, a altas temperaturas e em ambientes pobres de nutrientes (JHAJHARIA *et al.*, 2015).

Irrigantes endodônticos naturais

O uso de irrigantes endodônticos é essencial para desinfecção do sistema de canais radiculares, sendo atualmente, o hipoclorito de sódio (NaOCl) e a clorexidina os mais utilizados (RUKISAKIET *et al.* 2020). As soluções irrigadoras devem apresentar características ideais, como ter uma atividade antimicrobiana eficaz, não ser tóxico aos tecidos periapicais, apresentar substantividade, não prejudicar o reparo tecidual, não manchar a estrutura dentária, remover a *smear-layer*, bem como não deve prejudicar as propriedades da dentina exposta (TARTARI *et al.*, 2018; GOMES; AVEIRO. KISHEN, 2023).

NaOCL é a solução mais popularmente utilizada para irrigar os canais radiculares, isso porque além de ser um forte agente oxidante e apresentar potente efeito antimicrobiano, com capacidade de romper biofilmes e inativar endotoxinas, contém um efeito exclusivo de solvente tecidual (HAAPASALO *et al.*, 2014). Apesar das excelentes propriedades, o seu uso tem várias desvantagens inerentes, como alta toxicidade, cheiro e sabor desagradável e incapacidade de remover a *smear-layer* (GONÇALVES *et al.*, 2016; KIN; SHIN, 2017; ZOLLINGER *et al.*, 2019).

A clorexidina, utilizada na concentração de 2%, apresenta vantagens devido a sua eficaz atividade antimicrobiana, substantividade e baixa toxicidade, porém é incapaz de dissolver tecido pulpar e apresenta baixa compatibilidade com outros agentes. (GONÇALVES *et al.*, 2016; MARINHO *et al.*, 2018).

Diante das propriedades indesejáveis e insuficientes das soluções utilizadas na endodontia e do aumento da resistência dos microrganismos envolvidos na infecção dos

canais radiculares frente a elas, vários estudos na literatura buscam alternativas em produtos naturais que possam suprir tais limitações (Tabela 1).

Tabela 1- Produtos naturais usados como irrigantes na desinfecção de canais radiculares

Preparação	Produto natural	Propriedades	Referência
Extratos vegetais	Mamão-papaia (<i>Carica papaya</i> Linn.)		
	Aloe (<i>Aloe vera</i>)		Thomas <i>et al.</i> , 2017;
	Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>)	Atividade antimicrobiana contra <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i>	Noushad <i>et al.</i> , 2018; Divia <i>et al.</i> , 2018; Satti <i>et al.</i> , 2019.
	Goiabeira (<i>Psidium guajava</i>)		
	Triphala (<i>Terminalia bellerica</i>)		
	Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)		
	Açafrão-da-terra (<i>Curcuma longa</i>)		
	Neem (<i>Azadirachta indica</i>)		Saxena <i>et al.</i> , 2015; Sinha <i>et al.</i> , 2017; Zare <i>et al.</i> , 2017; Daga <i>et al.</i> , 2017; Noursadeh <i>et al.</i> , 2017; Parolia <i>et al.</i> , 2021; Panchal <i>et al.</i> , 2022; Mokhtari <i>et al.</i> , 2023; Durga <i>et al.</i> , 2023
	Própolis (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i>	
	Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)		
	Manjerona (<i>Origanum majorana</i>)		
	Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> sp.)		
	Murta (<i>Myrtus communis</i>)		
	Limão (<i>Citrus limon</i>)		Chhabra, Gyanani e Kamatagi 2015;
	Laranja Lima (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Remoção da <i>smear-layer</i>	Elkhashab <i>et al.</i> , 2018; Meyappan <i>et al.</i> , 2023
	Sapindus (<i>Sapindus mukorossi</i>)		
	Miwak (<i>Salvadora Persica</i>)		
	Orégano (<i>Origanum minutiflorum</i>)	Atividade antimicrobiana contra <i>E. faecalis</i> e	Jayahari; Niranjani; Kanaparthi, 2014; Ok <i>et</i>

Compostos isolados	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	remoção de <i>smear-layer</i>	<i>al.</i> , 2015; Gayathri <i>et al.</i> , 2020; Venkatahalamoorthi <i>et al.</i> , 2023
	Carvacrol	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i>	Veras <i>et al.</i> , 2014; Panchal <i>et al.</i> , 2022
	Timol		Jaiswal <i>et al.</i> , 2017; Elkhatab <i>et al.</i> , 2018
	Quitosana	Atividade antibiofilme contra <i>E. faecalis</i> e remoção da <i>smear-layer</i>	
Óleos essenciais	Menta (<i>Mentha piperina</i>)		Nabavizadeh <i>et al.</i> , 2014; Veras <i>et al.</i> , 2014; Marinković <i>et al.</i> , 2020; Qi <i>et al.</i> , 2021; Teja <i>et al.</i> , 2021
	Myrtus communis (Murta)		
	Palmarosa (<i>Cymbopogon martinii</i>)	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i>	
	Tomilho (<i>Thymus zygis</i>)		
	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)		
	Tea (<i>Melaleuca alternifolia</i>)		
	Alecrim-pimenta (<i>Lippia Sidoides</i>)		
	Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	Atividade antimicrobiana contra <i>Streptococcus mutans</i> e <i>E. faecalis</i>	Balhaddad e Sheikh, 2023
	Zataria multiflora (Wild marjoran)	Atividade antibiofilme contra <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i>	Sedigh-Shams <i>et al.</i> , 2016; Pordel <i>et al.</i> , 2024

Deste modo, um estudo in vitro de Noushad *et al.* (2018) avaliou a eficácia antimicrobiana de quatro extratos naturais: extrato da folha de mamão, *Aloe vera*, do caju e da folha de goiaba, em comparação com hipoclorito de sódio 5,25%. Foram avaliadas, por meio dos testes de difusão em disco, as atividades contra os patógenos endodônticos *E. faecalis* e *C. albicans* e foi possível concluir que os extratos da folha de goiaba e da

folha do caju apresentaram eficácia considerável, apesar do hipoclorito de sódio ter apresentado maior halo de inibição.

Neste mesmo contexto, Saxena *et al.* (2015) compararam a eficácia antimicrobiana de própolis, *Azadirachta indica*, *Triphala*, *Curcuma longa* e *Morinda citrifolia* com hipoclorito de sódio a 2,5% frente *E. faecalis*. Foram realizados testes de difusão em disco e foi possível observar uma maior zona de inibição entre os extratos herbais com a própolis, seguido da *Azadirachta indica*, sendo próximos ao hipoclorito de sódio.

Sinha *et al* (2017) também estudaram a atividade dos extratos da *A. indica* e *C. longa* e assim como outros achados da literatura, *A. indica* apresentou potente atividade antimicrobiana, não havendo diferença significativa com NaOCL 5% e clorexidina a 2%. Além da atividade antimicrobiana, alguns estudos mostram eficácia sinérgica deste composto com extrato de *Citrus limon* na remoção da *smear-layer*, sendo uma vantagem frente aos irrigantes convencionais (MEYAPPAN *et al.*, 2023).

Própolis, um material orgânico, biocompatível, apresenta excelentes propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias devido a presença de flavonoides em sua constituição (AGRAWAL *et al.*, 2017; PAROLIA *et al.*, 2020). O uso desse agente na Odontologia é bastante frequente devido a atividade antibiofilme comprovada. Diante disso, muitos estudos vêm avaliando a sua atividade contra os patógenos endodônticos. Durga *et al.* (2023), assim como Saxena *et al.* (2015), Zare *et al.* (2017) e Daga *et al.* (2017), descobriram excelente atividade antibacteriana de própolis “*in vitro*” contra biofilme de *E. faecalis*, sendo um promissor agente de irrigação.

Assim como própolis, a quitosana é um polissacarídeo natural já utilizado na Odontologia, que apresenta potente atividade antimicrobiana. Levando em consideração que os níveis de toxicidade dos irrigantes químicos estão diretamente relacionados com a concentração em que são utilizados, Jaiswal *et al.* (2017) demonstraram que a associação de quitosana 1% com a clorexidina a 1% contra patógenos endodônticos não apresentou diferença significativa quando comparada ao hipoclorito de sódio a 5% e clorexidina a 2%.

Além da propriedade antimicrobiana eficaz, os estudos de Elkhashab *et al.* (2018) mostraram atividade eficiente da quitosana na remoção da *smear layer*. Foi evidenciado que tanto quitosana a 2%, como o extrato de Miwask a 12,5%, extrato este derivado a partir da raiz do arbusto de Arrak (*Salvadora Pirsica*) que apresenta atividade comprovada

contra patógenos orais, são materiais promissores no processo de limpeza e desinfecção do canal radicular.

De acordo com a literatura, o extrato de *Origanum minutiflorum* também apresenta atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. Ok *et al.* (2015) realizaram um estudo “*ex-vivo*” comparativo do extrato do orégano com irrigantes químicos convencionais e quando usado nas concentrações de 2 e 5% foram mais eficazes no processo de irrigação dos sistemas de canais radiculares do que hipoclorito de sódio a 5,25%.

Chhabra, Gyanani e Kamatagi (2015) avaliaram a eficácia da remoção da *smear-layer* de dois extratos naturais: *Citrus aurantifolia* e *Sapindus mukorossi*. *C. aurantifolia* tem em sua composição o ácido cítrico que é o responsável pela remoção do esfregaço, porém devido à baixa capacidade de molhamento fez-se necessário a associação com outro agente natural, um biosurfactante que tem como principal função a dissociação de substâncias insolúveis em água. A proporção eficaz sob a matéria orgânica foi de 2:1, com concentrações de 0,12 g/ml de *C. aurantifolia* e 0,06 g/ml de extrato de *S. mukorossi* dissolvidos em água destilada.

Um outro agente natural disposto na literatura é *Passiflora edulis*, que se apresenta como um potencial irrigante intracanal por possuir propriedades ideais como atividade antimicrobiana, capacidade de remover *smear layer*, natureza atóxica, além de apresentar sabor e aroma aceitáveis, o que o torna vantajoso frente aos irrigantes convencionais (JAYAHARI; NIRANJAN; KANAPARTHY, 2014; GAYATHRI *et al.*, 2020; VENKATACHALAMOORTHY *et al.*, 2023).

Zingiber officinale, planta comumente conhecida por gengibre, é utilizada na medicina para o tratamento de muitas condições devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antivirais, e *Origanum majorana*, planta aromática multifuncional, também apresentam potencial terapêutico endodôntico (FIKRY; KHALIL; SALAMA, 2019). Um estudo recente comparou a atividade de extratos dessas plantas medicinais com irrigantes utilizados tradicionalmente e foi visto que não há diferença significativa entre as substâncias testadas no efeito inibitório da formação de biofilme, podendo ser consideradas soluções fitoterápicas eficazes para irrigação de canais radiculares (MOKHTARI *et al.*, 2023).

Triphala, erva medicinal utilizada na medicina popular, é mais uma alternativa fitoterápica na irrigação intracanal. Thomas *et al.* (2017) fizeram um estudo comparativo com o hipoclorito de sódio e avaliaram a atividade antimicrobiana de *Triphala* por meio

de um ensaio clínico randomizado, no qual houve uma maior redução nas unidades formadoras de colônia com o uso do agente fitoterápico, o que corrobora os achados de Divia *et al.* (2018) e Satti *et al.* (2019).

Panchal *et al.* (2022) pesquisaram irrigantes naturais que apresentassem eficácia semelhante ou melhor que a do NaOCl contra um patógeno endodôntico seletivo. Foi realizado um estudo “*ex-vivo*” utilizando raízes de dentes humanos extraídas e foram testados os extratos de *Eucalyptus*, *Triphala* e Carvacrol nas concentrações de 1,25%, 10% e 0,6%, respectivamente, em comparação com hipoclorito de sódio a 5,25%. Foi visto que o extrato de *Eucalyptus* apresentou eficácia semelhante ao do NaOCl, sendo mais eficiente que os demais compostos.

Noursadeh *et al.* (2017) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a atividade dos extratos de *Eucalyptus galbie* e *Myrtus communis*, e concluíram que os dois extratos apresentam atividade antimicrobiana aceitável contra *E. faecalis*, assim como outros achados na literatura (NABAVIZADEH *et al.*, 2014; PANCHAL *et al.*, 2022). Além disso, outros estudos comprovaram o efeito inibitório contra outros patógenos resistentes, como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (NABAVIZADEH *et al.*, 2014).

Alguns estudos tem avaliado a atividade de produtos naturais em nanopartículas com intuito de potencializar a atividade desses produtos na irrigação dos canais radiculares, as nanopartículas consistem em nanoformulações com produtos naturais que devido ao seu tamanho ultrapequeno melhora a penetração dos agentes nos túbulos dentinários e na estrutura do biofilme, potencializando a sua ação antimicrobiana (SHERESTHA; KISHEN, 2016).

Parolia *et al.* (2021) realizaram um estudo comparativo com nanopartículas contendo própolis, no qual compararam a atividade de própolis isolada e de nanopartículas de própolis em diferentes concentrações com NaOCl a 6% e clorexidina a 2%. Todos os irrigantes reduziram significativamente as unidades formadoras de colônias, porém o grupo de nanopartículas de própolis na concentração de 300 µg/mL foi tão eficaz quanto os irrigantes padrões, comprovando a potente atividade antimicrobiana das nanoformulações.

Além do uso de extratos naturais, os óleos essenciais também vêm sendo estudado como alternativa no processo de desinfecção dos canais radiculares. Os óleos essenciais são produtos naturais extraídos de diferentes partes das plantas e apresentam ampla

atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante, sendo um agente endodôntico promissor (NIKOLIĆ et al., 2016).

O óleo essencial da melaleuca, extraído de folhas de *Melaleuca alternifolia*, apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro contra patógenos orais, além de excelente biocompatibilidade (SHARIFI-RAD et al., 2017). Qi et al. (2021) avaliaram sua eficácia em diferentes concentrações em comparação com a clorexidina a 2% na inibição da formação e eliminação do biofilme formado de *E. faecalis*. Foi visto que quando em uma concentração de 0,5%, o óleo essencial foi capaz de inibir completamente a formação do biofilme, além disso, em concentrações acima de 0,25% o composto foi capaz de eliminar o biofilme formado, não havendo diferença significativa quando comparada à clorexidina.

Foi observado também que os óleos essenciais *Cymbopogon martinii* e *Thymus zygis* apresentam potencial efeito antimicrobiano contra patógenos endodônticos, acredita-se que essa atividade está associada ao alto teor de geraniol e timol em suas composições (BOGOJEVIĆ et al., 2016). Marinković et al. (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra *E. faecalis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* e foi possível concluir que os compostos naturais apresentaram excelentes propriedades antibiofilme, tendo *C. martinii* um melhor desempenho quando comparado ao *T. zygis*.

Pordel et al. (2024) concluíram em seus estudos que o óleo essencial da *Zataria multiflora* e da *Mentha piperina*, quando em concentrações a 2%, são capazes de eliminar *E. faecalis* durante a etapa de irrigação, apresentando maior eficácia quando comparada à clorexidina a 0,12%. Em contrapartida, Heidari et al. (2014) observaram em seus estudos que a atividade da *Zataria multiflora* 0,5% não foi tão eficaz quanto o hipoclorito a 2,5%. A partir desses achados, é possível concluir que assim como os irrigantes convencionais, a eficácia dos óleos essenciais pode estar associada com a concentração utilizada.

Além da atividade contra bactérias, a *Zataria multiflora* apresenta também potencial antifúngico. Sedigh-Shams et al. (2016) compararam a atividade do óleo essencial da planta com hipoclorito de sódio a 5% frente a *C. albicans* e concluíram que o composto tem efeito antifúngico aceitável, sendo um potencial irrigante intracanal.

Origanum vulgare é uma planta encontrada na Índia, popularmente utilizada para fins antissépticos, o óleo essencial dessa planta é utilizado em produtos alimentícios e apresenta potente atividade antimicrobiana (JANANI et al., 2019). Como irrigante

intracanal, foi visto que na concentração de 0,5%, o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou potente atividade antimicrobiana, sendo mais eficaz do que o hipoclorito de sódio a 2,5% e clorexidina a 2% (TEJA *et al.*, 2021).

Nabavizadeh *et al.* (2014) também compararam a atividade de um óleo essencial com dois irrigantes convencionais. Nesse estudo, foi avaliado a atividade do óleo essencial de *Myrtus communis* frente a cepas de *Streptococcus aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans* e foi possível concluir que esse óleo essencial apresentou atividade semelhante aos demais irrigantes, tendo potencial favorável para um irrigante intracanal. *M. communis* é uma árvore perene presente em regiões tropicais do mundo, o óleo essencial extraído de suas folhas apresenta ampla atividades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (ZOMORODIAN *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais são compostos por metabólitos secundários e muitas vezes o seu efeito terapêutico está associado a esses componentes. Veras *et al.* (2014) avaliaram a atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* e de seu composto majoritário de forma isolada, o timol, em comparação com hipoclorito de sódio e foi visto que tanto o óleo essencial como o timol, em concentrações de 2,5%, apresentaram atividade contra o biofilme de *E. faecalis*, podendo concluir que o timol é o responsável pela atividade antimicrobiana do óleo.

Balhaddad e Sheikh (2023) avaliaram a atividade do óleo do eucalipto frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *E. faecalis* e observaram que o óleo essencial apresenta potencial efeito antibiofilme contra as cepas testadas. O óleo essencial do eucalipto é extraído do *Eucalyptus globulus*, planta pertencente à família Myrtaceae, e apresenta potencial antimicrobiano comprovado na odontologia, sendo amplamente testado na área da periodontia (WÍNSKA *et al.*, 2019; LANDEO-VILLANUEVA *et al.*, 2023).

Produtos naturais como medicações intracanaís

O uso da medicação intracanal em alguns casos é essencial para alcançar a desinfecção necessária para o sucesso do tratamento. O Hidróxido de cálcio (CaOH_2) é a medicação intracanal padrão-ouro, sua atividade antimicrobiana ocorre por meio da dissociação dos íons cálcio e hidroxila quando em contato com fluidos, tornando o pH do meio mais alcalino (ESTRELA *et al.*, 2023). O uso desse composto requer a associação com um veículo, que pode ou não ter ação antimicrobiana e exerce um importante papel na velocidade do processo de dissociação (PEDRINHA *et al.*, 2022).

Apesar de suas excelentes propriedades, o hidróxido de cálcio mostra ação limitada contra várias espécies bacterianas, incluindo *E. faecalis* devido aos mecanismos de resistência desses microrganismos (PRADA *et al.*, 2019). Diante disso, os produtos naturais se tornam potenciais medicamentos intracanal, uma vez que podem apresentar atividade antimicrobiana eficaz contra determinados patógenos, suprimindo tais limitações (Tabela 2).

Tabela 2- Produtos naturais usados como medicação intracanal

Preparação	Produto natural	Atividade	Referência
Extratos vegetais	Mel		Saha; Nair; Asrani, 2015;
	Turmeric (<i>Curcuma Longa</i>)		Vasudeva <i>et al.</i> , 2017;
	Própolis (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i>	Raoof <i>et al.</i> , 2019;
	Aloe (<i>Aloe vera</i>)		Chasemi <i>et al.</i> , 2020;
	Cogumelo		Dessai <i>et al.</i> , 2022;
	Murta (<i>Myrtus communis L</i>)		Sofianini <i>et al.</i> , 2022;
	Eucalyptus (<i>Eucalyptus galbie</i>)		Patil <i>et al.</i> , 2022
	Guduchi (<i>Tinospora cordifolia</i>)		
	Neem (<i>Azadirachta indica</i>)		
	Tulsi (<i>Ocimum tenuiflorum</i>)		
	Chiretta verde (<i>Andrographis paniculata</i>)	Atividade antimicrobiana contra <i>E. faecalis</i>	Bardwaj <i>et al.</i> , 2017;
	Manjerição (<i>Ocimum sanctum Linn</i>)		Kalaisevam <i>et al.</i> , 2019;
	Ginger (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>)		Nasim <i>et al.</i> , 2022
Compostos isolados	Nisina	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i>	Somanath <i>et al.</i> , 2015;
	Quitosana		SHIN <i>et al.</i> , 2016;
	Acetato de etila		Volpato <i>et al.</i> , 2017;
			Parolia <i>et al.</i> , 2020;

Óleos essenciais	Bromelaína		Chandwani <i>et al.</i> , 2022; Nirmata <i>et al.</i> , 2022
	Camomila (<i>Matricaria chamomilla</i>)	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i>	Shakya <i>et al.</i> , 2019
	Vetiver (<i>Chrysopogon zizanioides</i>)		
	Oregano (<i>Origanum dubium</i> Boiss)	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i>	Cosan <i>et al.</i> , 2022
	Menta (<i>Mentha spicata</i>)	como veículo para medicação	
	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)		
	Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)		
	Laranja (<i>Citrus aurantium bergamia</i>)	Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra <i>E. faecalis</i> como veículo para medicação	Silva <i>et al.</i> , 2019; Falcon <i>et al.</i> , 2022; Magalhães <i>et al.</i> , 2024
	Copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>)		
	Caneleira-verdadeira (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)		
	Priprioca (<i>Cyperus articulatus</i> L.)		

Vasudeva *et al.* (2017) realizaram um estudo com intuito de identificar a eficácia antimicrobiana do mel, *Curcuma longa*, própolis e *Aloe vera* e comparar a efetividade com a clorexidina a 2% e hidróxido de cálcio nos períodos de exposição ao biofilme de *E. faecalis* de 1, 3 e 5 dias. Foi possível observar que própolis e *C. longa* apresentaram eficácia antimicrobiana maior que o hidróxido de cálcio nos períodos testados, indo ao encontro de outros achados da literatura (SAHA; NAIR; ASRANI, 2015).

Shakya *et al.* (2019) também avaliaram o efeito antimicrobiano de óleos essenciais em diferentes períodos. Os óleos extraídos das raízes de *Chrysopogon zizanioides* e flores de *Matricaria chamomilla*, foram avaliados nos períodos de 1, 7 e 14 dias e comparados com clorexidina e hidróxido de cálcio frente ao biofilme de *E. faecalis*. Os resultados do estudo mostraram que o óleo essencial de camomila é eficaz no tratamento da infecção

do canal radicular quando comparado com a Clorexidina e o Hidróxido de cálcio, enquanto o óleo de vetiver não sustentou sua atividade por mais tempo, sendo uma desvantagem para o uso como medicação.

Neste mesmo contexto, Patil *et al.* (2022) avaliaram a atividade dos extratos de cogumelo, *Aloe vera* e *Curcuma longa* comparados ao hidróxido de cálcio contra *E. faecalis*. Neste estudo, diferente dos anteriores, o tempo de exposição foi de até 14 dias, e foi possível observar que o CaOH₂ apresentou redução máxima das unidades formadoras de colônia a partir do 7º dia, porém, ainda assim o extrato de *C. longa* apresentou maior efetividade.

Aloe vera, também conhecido como babosa, é um composto fitoterápico bastante estudado na endodontia, apresenta atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, além de ser biocompatível e não apresentar toxicidade (AMJED *et al.*, 2017). Diante de suas características, Chasemi *et al.* (2020) avaliaram a sua atividade antibiofilme como medicamento intracanal. O biofilme de *E. faecalis* foi formado nos períodos de 4 e 6 semanas para a realização dos testes e foi possível concluir que o extrato natural de *Aloe vera* apresentou atividade antibiofilme aceitável, assim como os medicamentos padrões, corroborando com outros achados (VARSHINI *et al.*, 2019).

Bardwaj *et al.* (2017) avaliaram a atividade de 3 extratos naturais como medicação intracanal: *Neem*, *Tulsi* e *Guduchi*, em comparação com Clorexidina a 2%. As soluções foram inseridas e mantidas por 48 horas em dentes humanos extraídos, e foi possível concluir ao comparar os três medicamentos fitoterápicos, que o *Neem* apresentou potente atividade antibacteriana, sendo um agente promissor.

Nisina, um peptídeo antimicrobiano, de acordo com a literatura é eficaz contra microrganismos que apresentam resistência a terapias antibióticas convencionais (SHIN *et al.*, 2016). Nirmata *et al.* (2022) avaliaram a atividade antimicrobiana desse composto e foi possível observar potente atividade contra *E. faecalis*, sendo semelhante à clorexidina a 2%, em contrapartida, nos estudos de Somanath *et al.* (2015), a nisina apresentou-se mais potente que a clorexidina a 2%.

Com intuito de potencializar a atividade do CaOH₂, alguns autores sugerem a veiculação do pó de hidróxido de cálcio em compostos naturais. Sofianini *et al.* (2022) compararam o uso da medicação com dois veículos diferentes, própolis e Clorexidina a 2%, foi visto que a associação com o composto natural apresentou maior eficácia contra *E. faecalis*. Em contrapartida, Raoof *et al.* (2019) concluíram em seus achados que os extratos metanólicos *Myrtus communis* L. e *Eucalyptus galbie* apresentam potente

atividade antimicrobiana, porém não apresentaram sinergismo com CaOH_2 , não sendo capazes de eliminar as bactérias quando combinados.

Nesse mesmo contexto, Falcon *et al.* (2022) avaliaram a eficácia de dois óleos essenciais, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*, frente ao biofilme de *E. faecalis* e compararam a sua atividade quando associado ao hidróxido de cálcio. Foi possível concluir que o óleo da canela apresentou potencial terapêutico frente aos microrganismos e que não houve diferença significativa entre o uso do óleo sozinho e associado ao hidróxido de cálcio, mostrando potente atividade do produto natural.

Outros óleos essenciais, como *Rosmarinus officinalis* L., *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium bergamia* e *Copaifera officinalis* também foram testados como veículos para o hidróxido de cálcio, sendo a combinação desses compostos naturais promissora para uso como medicação intracanal devido sua eficácia contra *E. faecalis*. Destes compostos naturais, *Rosmarinus officinalis* L mostrou-se mais eficaz que os demais (SILVA *et al.*, 2019).

Cosan *et al.* (2022) também avaliaram o efeito de produtos naturais como veículo para o hidróxido de cálcio. Foram testados os óleos essenciais de *Origanum dubium* e *Mentha spicata* frente ao biofilme de *C. albicans* e *E. faecalis*, e foi possível concluir que os compostos naturais são promissores agentes antimicrobianos, porém apresentam maior eficácia contra fungos. Vale ressaltar que o óleo essencial da *M. spicata* mostrou-se mais potente quando testado como veículo para o hidróxido de cálcio.

Levando em consideração o importante papel que o veículo desempenha nas pastas de medicação intracanal, Magalhães *et al* (2024) avaliaram a atividade do óleo essencial da *Cyperus articulatus*, popularmente conhecido como pripioca, frente ao biofilme de *E. faecalis*. O produto natural apresentou excelente efeito antimicrobiano, e sua associação com hidróxido de cálcio também mostrou alta capacidade de reduzir o biofilme maduro de *E. faecalis*, a medicação utilizada como controle, Bio-C Temp, teve um menor efeito antimicrobiano e antibiofilme.

Assim como nos irrigantes intracanaís, Parolia *et al.* (2020) avaliaram a atividade de nanopartículas contendo quitosana e própolis como medicamento intracanal frente a bactérias endodônticas persistentes. Os testes foram realizados nos períodos de 1, 3 e 7 dias de exposição, com diferentes concentrações dos extratos. Foi visto que as nanopartículas contendo própolis e quitosana a 250 µg/ml apresentaram maior eficácia na redução das unidades formadoras de colônia nos primeiros dias de teste diferente das medicações padrões, sendo uma potente medicação intracanal para uso futuro.

Nasim *et al.* (2022) sintetizaram nanopartículas de prata a base de hidróxido de cálcio contendo os extratos de *Andrographis paniculata*, planta medicinal que apresenta ampla atividade antimicrobiana na literatura, e *Ocimum sanctum* Linn, um manjerição com excelentes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (YAMANI *et al.* 2016). Em seus estudos foram avaliados tanto a atividade antimicrobiana, em que as nanopartículas apresentaram atividade semelhante ao CaOH_2 contra bactérias, porém sua atividade antifúngica foi mais efetiva quando comparada ao medicamento, como a citotoxicidade, em que demonstrou-se ser menos citotóxica, podendo essa característica ser atribuída pela presença dos produtos naturais (NASIM *et al.* 2022).

O extrato de gengibre seco, rizoma de *Zingiber officinale*, tem como principal componente ativo o gingerol, que é responsável pela potente atividade antimicrobiana do gengibre. Um estudo na literatura mostra que esse agente fitoterápico apresenta eficácia antimicrobiana contra patógenos endodônticos, podendo também ser considerado para uso como medicamento intracanal na prática endodôntica (KALAISEVAM *et al.* 2019).

Volpato *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de um outro produto natural, o extrato de *Persea major* Kopp (Lauraceae), foi visto em seus estudos que o extrato bruto não apresentou atividade contra o *E. faecalis*, mas quando fracionado, o acetato de etila apresentou potente atividade antimicrobiana quando comparado ao hidróxido de cálcio associado à clorexidina a 2%.

Em alguns casos, levando em consideração a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas, é usado como medicação intracanal uma pasta antibiótica tripla (TAP), que é composta por uma mistura entre os antibióticos ciprofloxacino, metronidazol e minociclina (DIOGENES *et al.*, 2013). Alguns estudos na literatura buscam agentes naturais que possam substituir essa medicação, pois dentre as suas desvantagens está o seu potencial de descoloração dentária e a resistência dos microrganismos (MONTERO-MIRALLES *et al.* 2018).

Diante disso, Dessai *et al.* (2022) compararam a atividade do extrato de ácido carnósico, derivado da *Rosmarinus officinalis* L., com hidróxido de cálcio e a TAP, tendo sido visto que com 14 dias de exposição ao biofilme de *E. faecalis*, as três substâncias apresentaram eficácia antimicrobiana semelhante, assim como nos estudos de Chandwani *et al.* (2022), que compararam a atividade antimicrobiana da Bromelaína, resultando em potente atividade frente às outras medicações.

O óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* também foi estudado e comparado com a TAP, foi possível observar que o composto natural apresenta ampla atividade

antimicrobiana quando comparada com a medicação, além disso o óleo essencial apresentou melhor biocompatibilidade, sendo um promissor agente de desinfecção (ABBASZADEGAN *et al.* 2016).

CONCLUSÃO

O tratamento endodôntico tem como principal objetivo eliminar ou reduzir os microrganismos presentes na infecção do sistema de canais radiculares. Diante das desvantagens encontradas na ação das soluções irrigadoras e medicações intracanaís mais comumente utilizadas na endodontia, muitos produtos naturais vêm sendo estudados com essa finalidade.

Esse trabalho mostra um potencial importante de atividades antimicrobiana/antibiofilme de produtos *naturais* contra patógenos constantemente encontrados na infecção endodôntica. É possível concluir que essas substâncias são alternativas potenciais para substituir os agentes químicos utilizados atualmente, porém faz-se necessário mais estudos sobre as propriedades desses produtos naturais e sua atividade *in-vivo*.

REFERÊNCIAS

- Abbaszadegan A, Dadolahi S, Gholami A, Moein MR, Hamedani S, Ghasemi Y, Abbott PV. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. **J Contemp Dent Pract.** 2016 Feb 1;17(2):105-13.
- Agrawal V, Kapoor S, Agrawal I. Critical Review on Eliminating Endodontic Dental Infections Using Herbal Products. **J Diet Suppl.** 2017 Mar 4;14(2):229-240.
- ALGHAMDI, Faisal; ALHADDAD, Abdulrahman J.; ABUZINADAH, Samar. Healing of periapical lesion after surgical endodontic retreatment: A systematic review. **Cureus**, v. 12, n. 2, e6916, 2020.
- Almadi EM, Almohaimede AA. Natural products in endodontics. **Saudi Med J.** 2018 Feb;39(2):124-130.
- Amjed S, Junaid K, Jafar J, Amjad T, Maqsood W, Mukhtar N, Tariq K, Sharif M, Awan SJ, Ansari F. Detection of antibacterial activities of Miswak, Kalonji and Aloe vera against oral pathogens & anti-proliferative activity against cancer cell line. **BMC Complement Altern Med.** 2017 May 15;17(1):265.
- Balhaddad AA, AlSheikh RN. Effect of *Eucalyptus* oil on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* growth. **BDJ Open.** 2023 Jul 6;9(1):26.

Bhardwaj A, Srivastava N, Rana V, Adlakha VK, Asthana AK. How efficacious are *Neem*, *Tulsi*, Guduchi extracts and chlorhexidine as intracanal disinfectants? A comparative “*Ex vivo*” study. **Ayu**. 2017 Jan-Jun;38(1-2):70-75.

Bogojevic J, Nikolic M, Markovic T, Ciric A, Markovic D (2016) Analysis of chemical composition of the most efficient essential oils towards *Enterococcus faecalis* referent strain ATCC 29212 and clinical isolates. **Med Raw Mater** 36:3–25

Chandwani ND, Maurya N, Nikhade P, Chandwani J. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, triple antibiotic paste and bromelain against *Enterococcus faecalis*: An “*In Vitro*” study. **J Conserv Dent**. 2022 Jan-Feb;25(1):63-67.

Chhabra N, Gyanani H, Kamatagi L. Smear layer removal efficacy of combination of herbal extracts in two different ratios either alone or supplemented with sonic agitation: An “*In vitro*” scanning electron microscope study. **J Conserv Dent**. 2015 Sep-Oct;18(5):

Cosan G, Ozverel CS, Yigit Hanoglu D, Baser KHC, Tunca YM. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Calcium Hydroxide Mixed with Two Different Essential Oils. **Molecules**. 2022 Apr 20;27(9):2635.

Daga P, Asrani H, Farista S, et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Neem*, miswak, *Própolis* and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* using EndoVac. **Int J Prosthodont Restor Dent**. 2017; 7(2):60–65.

de Magalhães Silveira CF, da Silveira Bueno CE, Schreiber AZ. Cytocompatibility and Antibiofilm Activity of Calcium Hydroxide Mixed with *Cyperus articulatus* Essential Oil and Bio-C Temp Bioceramic Intracanal Medicament. **Antibiotics**. 2024; 13(7):637.

Dessai A, Shetty N, Saralaya V, Natarajan S, Mala K. Carnosic Acid as an intracanal medicament performs better than triple antibiotic paste and calcium hydroxide to eradicate *Enterococcus faecalis* from root canal: An “*In vitro*” confocal laser scanning microscopic study. **J Conserv Dent**. 2022 Jan-Feb;25(1):20-25.

Divia AR, Nair MG, Varughese JM, Kurien S. A comparative evaluation of *Morinda citrifolia*, green tea polyphenols, and Triphala with 5% sodium hypochlorite as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*: An “*In vitro*” study. **Dent Res J (Isfahan)**. 2018 Mar-Apr;15(2):117-122

Durga BG, Rathod T, Parveen N, Tirupathi P, Dharavattu P, Sekhar V, Sharma D, Anlesteffey SG. Assessment of the Antimicrobial Effectiveness of Herbal Root Canal Irrigants (*Própolis*, Triphala, and *Aloe Vera*) and Chlorhexidine Against *Enterococcus faecalis*. **Cureus**. 2023 Jul 10;15(7):e41628.

Elkhashab RAM, Kataia MA, Kamel WH, Shaaban M. Comparison of antibacterial effect and smear layer removal of herbal versus traditional irrigants – An “*In vitro*” study, **Future Dental Journal**, Volume 4, Issue 2, 2018, Pages 165-169

Estrela C, Cintra LTA, Duarte MAH, Rossi-Fedele G, Gavini G, Sousa-Neto MD. Mechanism of action of Bioactive Endodontic Materials. **Braz Dent J**. 2023 Jan-Feb;34(1):1-11.

Falcon, Carla Yvonne; Abdelkarim, Sally; Falcon, Paul A.; Hirschberg, Craig S.; Cugini, Carla1. The effect of Cinnamon and Ginger essential oils against *Enterococcus faecalis*

biofilm: An “*In vitro*” feasibility study. **Endodontology** 34(4):p 229-235, Oct–Dec 2022

Fikry S, Khalil N, Salama O. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. **AMB Express**. 2019 Mar 26;9(1):41.

Gayathri K, Prathima GS, Sajeev R. Antimicrobial efficacy of passion fruit extract against *Enterococcus faecalis*- an in vitro study. **Int J Sci Res**. 2020;76–78.

Ghasemi N, Behnezhad M, Asgharzadeh M, Zeinalzadeh E, Kafil HS. Antibacterial Properties of *Aloe vera* on Intracanal Medicaments against *Enterococcus faecalis* Biofilm at Different Stages of Development. **Int J Dent**. 2020 Dec

Gomes BPFA, Aveiro E, Kishen A. Irrigants and irrigation activation systems in Endodontics. **Braz Dent J**. 2023 Jul-Aug;34(4):1-33.

Gonçalves LS, Rodrigues RC, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. **J Endod**. 2016 Apr;42(4):527-32.

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. **Br Dent J**. 2014 Mar;216(6):299-303. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.204.

Haldal S., Arafath K.M.Y., Subair K., Joseph K. Biofilms in endodontics. **J. Int. Oral Health**. 2016;8:827.

Heidari AR. Comparative evaluation of the antiseptic effects of sodium hypochlorite, thyme essence and normal saline solution in root canal irrigation of primary teeth. **J Dent Med**. 2014; 27 (3):161–7.

J. Sharifi-Rad, B. Salehi, E.M. Varoni, F. Sharopov, Z. Yousaf, S.A. Ayatollah, F. Kobarfard, M. Sharifi-Rad, M.H. Afdjei, M. Sharifi-Rad. Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: from farm to pharmacy. **Phytother Res.**, 31 (2017), pp. 1475-1494

Jaiswal N, Sinha DJ, Singh UP, Singh K, Jandial UA, Goel S. Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm: An “*in vitro*” study. **J Clin Exp Dent**. 2017 Sep 1;9(9):e1066-e1074.

Janani K, Ajitha P, Sandhya R, Teja KV. Chemical constituent, minimal inhibitory concentration, and antimicrobial efficiency of essential oil from *Oreganum vulgare* against *Enterococcus faecalis*: An “*In vitro*” study. **J Conserv Dent**. 2019 Nov-Dec;22(6):538-543.

Jayahari NK, Niranjan NT, Kanaparthi A. The efficacy of passion fruit juice as an endodontic irrigant compared with sodium hypochlorite solution: an “*In vitro*” study. **J Invest Clin Dent**. 2014 May;5(2):154-60.

Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. **J Int Soc Prev Community Dent**. 2015 Jan-Feb;5(1):1-12.

Kalaiselvam R, Soundararajan K, Rajan R M, Deivanayagam K, Arumugam C, Ganesh A. Comparative Evaluation of the Anti-bacterial Efficacy of Herbal Medicaments and Synthetic Medicaments Against *Enterococcus faecalis* using Real-time Polymerase Chain Reaction. **Cureus**. 2019 Jul 24;11(7):e5228.

- Kim SW, Shin DH. Antibacterial effect of urushiol on *E. faecalis* as a root canal irrigant. **Restor Dent Endod.** 2017;42(1):54–59. doi: 10.5395/rde.2017.42.1.54.
- Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD. Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. **J Int Oral Health.** 2015 Feb;7(2):42-5.
- Landeo-Villanueva GE, Salazar-Salvatierra ME, Ruiz-Quiroz JR, Zuta-Arriola N, Jarama-Soto B, Herrera-Calderon O, Pari-Olarte JB, Loyola-Gonzales E. Inhibitory Activity of Essential Oils of *Mentha spicata* and *Eucalyptus globulus* on Biofilms of *Streptococcus mutans* in an “*In Vitro*” Model. **Antibiotics (Basel).** 2023 Feb 10;12(2):369.
- LOPES, Hélio; SIQUEIRA JR, José Freitas. Endodontia: biologia e técnica. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1801 p.
- M. Nikolić, T. Marković, D. Marković, J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Smiljković, et al. Antibacterial activity of three Lamiaceae essential oils against common oral pathogens **Balkan Journal of Dental Medicine**, 20 (2016), pp. 160-167
- Marinho ACS, To TT, Darveau RP, Gomes BPFA. Detection and function of lipopolysaccharide and its purified lipid A after treatment with auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings used in root canal treatment. **Int Endod J.** 2018;51(10):1118–1129.
- Marinković J, Ćulafić DM, Nikolić B, Đukanović S, Marković T, Tasić G, Ćirić A, Marković D. Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. **Arch Oral Biol.** 2020
- Mergoni G, Ganim M, Lodi G, Figini L, Gagliani M, Manfredi M. Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth. **Cochrane Database Syst Rev.** 2022 Dec 13;12(12)
- Meyappan N, Mahadevan M, Manimaran ND, Paulaiyan B, Gopal R, Kumar N. Scanning Electron Microscopy Analysis of Smear Layer Removal Ability of Conventional Endodontic Irrigation Regimen, MTAD, and QMix™ Versus a Mixture of *Azadirachta indica* and *Citrus limon*: An “*In Vitro*” Study. **Cureus.** 2023 Aug 2;15(8):e42877.
- MOHAMMADI Z, DUMMER PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **Internatinal of Endodontics Journal**, v.44, n.8, p.697-730, 2020
- Mokhtari H, Eskandarinezhad M, Barhaghi MS, Asnaashari S, Sefidan FY, Abedi A, Alizadeh S. Comparative antibacterial effects of ginger and marjoram extract versus conventional irrigants on mature *Enterococcus faecalis* biofilms: An “*In vitro*” study. **J Clin Exp Dent.** 2023 Apr 1;15(4):e304-e310.
- Montero-Mirallès P, Martín-González J, Alonso-Ezpeleta O, Jiménez-Sánchez MC, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. Effectiveness and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontic procedures: a review. **Int Endod J.** 2018 Sep;51(9):981-988.

Nabavizadeh M, Abbaszadegan A, Gholami A, Sheikhi R, Shokouhi M, Shams MS, Ghasemi Y. Chemical constituent and antimicrobial effect of essential oil from *Myrtus communis* leaves on microorganisms involved in persistent endodontic infection compared to two common endodontic irrigants: An “*In vitro*” study. **J Conserv Dent.** 2014 Sep;17(5):449-53.

Nasim I, Jabin Z, Kumar SR, Vishnupriya V. Green synthesis of calcium hydroxide-coated silver nanoparticles using *Andrographis paniculata* and *Ocimum sanctum* Linn. leaf extracts: An antimicrobial and cytotoxic activity. **J Conserv Dent.** 2022 Jul-Aug;25(4):369-374.

NEELAKANTAN, Prasanna et al. Biofilms in Endodontics—Current Status and Future Directions. **Internatinal Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 8, p.1748. aug. 2017.

Nirmala S, L R S, Reddy N, Reddy SD, Chukka RR, Kumar K N. Antimicrobial Efficacy of Morinda citrifolia, Nisin, and 2% Chlorhexidine Against *Enterococcus faecalis*: An In-Vitro Study. **Cureus.** 2022 Mar 16;14(3):e23206.

Nourzadeh M, Amini A, Fakoor F, Raoof M, Sharififar F. Comparative Antimicrobial Efficacy of *Eucalyptus Galbie* and *Myrtus Communis L.* Extracts, Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus Faecalis*. **Iran Endod J.** 2017 Spring;12(2):205-210.

Noushad MC, Balan B, Basheer S, Usman SB, Muhammed Askar MK. Antimicrobial Efficacy of Different Natural Extracts Against Persistent Root Canal Pathogens: An “*In vitro*” Study. **Contemp Clin Dent.** 2018 Apr-Jun;9(2):177-181.

Ok E, Adanir N, Ozturk T. Antibacterial and smear layer removal capability of oregano extract solution. **Eur J Dent.** 2015 Jan-Mar;9(1):20-24. doi: 10.4103/1305-7456.149633.

Panchal VV, Dahake PT, Kale YJ, Dadpe MV, Kendre SB. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, Triphala, *Eucalyptus*, and Carvacrol against *Enterococcus faecalis*: An “*In Vitro*” study. **Int J Clin Pediatr Dent.** 2022 Sep-Oct;15(5):514-519.

Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Davamani F, Pau A. Effectiveness of chitosan-Própolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. **BMC Oral Health.** 2020 Nov 25;20(1):339.

Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Madheswaran T, Davamani F, Pichika MR, Mak KK, Fawzy AS, Daood U, Pau A. Effect of Própolis Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm in the Root Canal. **Molecules.** 2021 Jan 30;26(3):715.

Patil V, Akal N, Biradar S, Ratnakar P, Rairam S, Batta O. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of mushroom, *Aloe vera*, and *Curcuma longa* with calcium hydroxide as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. **J Conserv Dent.** 2022 Jul-Aug;25(4):415-419.

PEDRINHA V.F. *et al.* The Vehicles of Calcium Hydroxide Pastes Interfere with Antimicrobial Effect, Biofilm Polysaccharidic Matrix, and Pastes' Physicochemical Properties. **Biomedicines**, v.10, n.12, p.3123, 2022

Pereira TC, Dijkstra RJB, Petridis X, Sharma PK, van de Meer WJ, van der Sluis LWM, de Andrade FB. Chemical and mechanical influence of root canal irrigation on biofilm

removal from lateral morphological features of simulated root canals, dentine discs and dentinal tubules. **Int Endod J.** 2021 Jan;54(1):112-129.

Pordel E, Kiani M, Jafari A, Heidari AR, Bakhtiari R. Antimicrobial Efficacy of Saline, Chlorhexidine, and *Zataria Multiflora* and *Mentha Piperita* Essential Oils in Root Canal Irrigation of Primary Molars. **Front Dent.** 2024 Jun 2;21:19.

PRADA I. *et al.* Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Oral Medicine and Oral Pathology and bucal cirurgy.** v.24, n.3, e364-e372, 2019

Qi J, Gong M, Zhang R, Song Y, Liu Q, Zhou H, Wang J, Mei Y. Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on *Enterococcus faecalis* and biofilm “*in vitro*”. **J Ethnopharmacol.** 2021 Dec 5;281:114566

Raoof M, Khaleghi M, Siasar N, Mohammadalizadeh S, Haghani J, Amanpour S. Antimicrobial Activity of Methanolic Extracts of *Myrtus Communis L.* and *Eucalyptus Galbie* and their Combination with Calcium Hydroxide Powder against *Enterococcus Faecalis*. **J Dent (Shiraz).** 2019 Sep;20(3):195-202.

Saha S, Nair R, Asrani H. Comparative Evaluation of Propolis, Metronidazole with Chlorhexidine, Calcium Hydroxide and *Curcuma Longa* Extract as Intracanal Medicament Against *E. faecalis*- An “*In vitro*” Study. **J Clin Diagn Res.** 2015 Nov;9(11)

Satti P, Kakarla P, Jogendra Avula SS, Muppa R, Kiran Rompicharla SV, Biswas S. Indigenous irrigants as potent antimicrobials in endodontic treatment: An *in vitro* study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent.** 2019 Jul-Sep;37(3):275-281.

Saxena D, Saha SG, Saha MK, Dubey S, Khatri M. An in vitro evaluation of antimicrobial activity of five herbal extracts and comparison of their activity with 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. **Indian J Dent Res.** 2015 Sep-Oct;26(5):524-7

Sedigh-Shams M, Badiie 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.

Shakya VK, Luqman S, Tikku AP, Chandra A, Singh DK. A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with calcium hydroxide and chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis* in “*Ex vivo*” root canal models. **J Conserv Dent.** 2019 Jan-Feb;22(1):34-39.

Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. **J Appl Microbiol.** 2016 Jun;120(6):1449-65.

Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. **J Endod.** 2016 Oct;42(10):1417-26.

Silva S, Alves N, Silva P, Vieira T, Maciel P, Castellano LR, Bonan P, Velozo C, Albuquerque D. Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium bergamia*, and *Copaifera officinalis* Alone and in Combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. **Biomed Res Int.** 2019

Sinha J.D, D S Nandha K, Jaiswal N, Vasudeva A, Prabha Tyagi S, Pratap Singh U. Antibacterial Effect of *Azadirachta indica* (Neem) or *Curcuma longa* (Turmeric) against

- Enterococcus faecalis* compared with that of 5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine in vitro. **Bull Tokyo Dent Coll.** 2017;58(2):103-109.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. **Clin Microbiol Rev.** 2013 Apr;26(2):255-73.
- Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Braz Oral Res.** 2018 Oct 18;32(suppl 1):e65
- Sofiani E, Wahyuningrum H. Differential effectiveness of calcium hydroxide with 2% chlorhexidine digluconate and 25% propolis as a root canal medicament against *Enterococcus faecalis* “in vitro”. **Sci Dent J.** 2021; 5:37
- Somanath G, Samant PS, Gautam V, Singh Birring OJ. To comparatively evaluate the antimicrobial efficacy of chlorhexidine, nisin and linezolid as an intracanal medicament on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. **Indian J Dent Res.** 2015 Nov-Dec;26(6):613-8
- Tartari T, Wichnieski C, Bachmann L, Jafelicci M Jr, Silva RM, Letra A, van der Hoeven R, Duarte MAH, Bramante CM. Effect of the combination of various irrigants on the surface properties of dentin, adsorption of Chlorhexidine and adhesion of microorganisms to dentin. **Int Endod J.** 2018;51(12):1420-1433.
- TAWFIK, Sally Ali et al. Illumina MiSeq Sequencing for Preliminary Analysis of Microbiome Causing Primary Endodontic Infections in Egypt. **Int J Microbiol.**, v. 2018, n. 1, 2018.
- Teja KV, Janani K, Kaligotla VA, Harini K. Comparative antimicrobial efficacy of oregano oil, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An: in vitro: study. **Endodontol.** 2021;33:97–101.
- Thomas S, Asokan S, John B, Priya G, Kumar S. Comparison of Antimicrobial Efficacy of Diode Laser, Triphala, and Sodium Hypochlorite in Primary Root Canals: A Randomized Controlled Trial. **Int J Clin Pediatr Dent.** 2017 Jan-Mar;10(1):14-17.
- Varshini R, Subha A, Prabhakar V, Mathini P, Narayanan S, Minu K. Antimicrobial Efficacy of *Aloe vera*, Lemon, *Ricinus communis*, and Calcium Hydroxide as Intracanal Medicament Against *Enterococcus faecalis*: A Confocal Microscopic Study. **J Pharm Bioallied Sci.** 2019 May;11
- Vasudeva A, Sinha DJ, Tyagi SP, Singh NN, Garg P, Upadhyay D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. **Singapore Dent J.** 2017 Dec;38:39-44.
- Venkatachalamoorthi V, Shivashankarappa PG, Adimoulame S, Gurusamy K, Muthukrishnan K, Govindan E. Effect of Passion Fruit Juice in Removal of Smear Layer in Root Canal of “*Ex Vivo*” Human Teeth: A Scanning Electron Microscopic Study. **Int J Clin Pediatr Dent.** 2023 Sep;16(Suppl 2):190-194.
- Veras HN, Rodrigues FF, Botelho MA, Menezes IR, Coutinho HD, da Costa JG. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. **ScientificWorldJournal.** 2014

- Volpato L, Gabardo MC, Leonardi DP, Tomazinho PH, Maranhão LT, Baratto-Filho F. Effectiveness of *Persea major* Kopp (Lauraceae) extract against *Enterococcus faecalis*: a preliminary in vitro study. **BMC Res Notes**. 2017 Mar 6;10(1):119.
- Wińska K., Mączka W., Łyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? **Molécules**. 2019; 24 :2130.
- Yamani HA, Pang EC, Mantri N, Deighton MA. Antimicrobial Activity of Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) Essential Oil and Their Major Constituents against Three Species of Bacteria. **Front Microbiol**. 2016
- Zakaria, MN et al. Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. **International Endodontic Journal**, v. 48, n.8, p. 717–728, 2015.
- Zare JM, Tahmoorepour A, Hemmat N, et al. Comparison of the antibacterial effect of Propolis, 5.25% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine as intracanal irrigants against *Enterococcus faecalis*: an ex vivo study. **Caspian J Dent Res**. 2017; 29:35
- Zomorodian K, Moein M, Goeini Lori Z, Ghasemi Y, Rahimi MJ, Bandegani A, et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from *Myrtus communis* Leaves. **J Essential Oil Bearing Plants**. 2013; 16 :76–84.
- Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. **Br Dent J**. 2014 Mar;216(6):299-303.
- Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-Ngoen T, Garami A, Mikó A, Varga G, Lohinai Z. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **J Endod**. 2020 Aug;46(8):1032-1041.
- Diogenes A , Henry MA , Teixeira FB , Hargreaves KM (2013) Uma atualização sobre endodontia regenerativa clínica . **Tópicos Endodônticos** 28 , 2 – 23 .
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. **Int Endod J**. 2022 May;55 Suppl 3:512-530.