

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

Potencial antimicrobiano da associação de óleos essenciais *Tea Tree* (*Melaleuca alternifolia*) e *Petitgrain* (*citrus aurantium*) contra microrganismos presentes no sistema de canais radiculares: Estudo *in vitro*

Karla Viviana Valencia Ballesteros

Brasília, 2021

KARLA VIVIANA VALENCIA BALLESTEROS

Potencial antimicrobiano da associação de óleos essenciais *Tea Tree* (*Melaleuca alternifolia*) e *Petitgrain* (*citrus aurantium*) contra microrganismos presentes no sistema de canais radiculares: Estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles

Brasília, 2021

KARLA VIVIANA VALENCIA BALLESTEROS

Potencial antimicrobiano da associação de óleos essenciais *Tea Tree* (*Melaleuca alternifolia*) e *Petitgrain* (*citrus aurantium*) contra microrganismos presentes no sistema de canais radiculares: Estudo *in vitro*

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 12/07/2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles (Orientadora)

Prof. Dr. Márcio Alex Barros Gomes (membro)

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira (membro)

Profa. Dra. Carla Massignan (suplente)

*Dedico este trabalho as minhas filhas que são
meu motor para continuar lutando na vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por ser meu apoio e ajuda para me tornar uma pessoa melhor cada dia.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles, por me brindar seus conhecimentos para ser uma pesquisadora mais competente e uma pessoa mais forte.

Agradeço ao técnico Rafael Brasil por seu apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório da Biomol e a sua equipe, Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres e Dra. Ana Alfonso Pérez, por oferecer a sua estrutura, equipamentos e conhecimentos para que a realização desta pesquisa fosse possível.

Agradeço as meus professores Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira, Prof. Dr. Jacy Carvalho Junior e ao técnico Edivaldo Batista Teles por me abrir as portas da sua casa e me ensinar com tanto carinho e paciência a arte da endodontia.

Agradeço aos professores Prof. Dr. Marcio Alex Barros, Prof. MSc. Marcio Amaral, Prof. MSc. Marcos Santiago, Prof. MSc. Rodrigo Aucelio, pela paciência, ensinamentos e pelo grande exemplo profissional.

Agradeço a Deus por sempre me dar mais do que eu mereço e por ter conhecido pessoas tão maravilhosas.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1.	JUSTIFICATIVA	12
1.2.	OBJETIVO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.	O SISTEMA DE CANAIS RADICULARES	13
2.2.	OS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS SISTEMAS DE CANAIS RADICULARES	14
2.2.1.	<i>Enterococcus faecalis</i>	17
2.2.2.	<i>Candida Albicans</i>	19
2.2.3.	<i>Staphylococcus</i>	21
2.2.4.	<i>Streptococcus mutans</i>	22
2.2.5.	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	22
3.	AS SOLUÇÕES AUXILIARES	24
3.1.	Hipoclorito de Sódio (NaOCl)	24
3.2.	Clorexidina	26
3.3.	Fitoterápicos	27
3.3.1.	Tea Tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	31
3.3.2.	Óleo essencial Petitgrain (<i>Citrus aurantium L.</i>)	31
4.	METODOLOGIA	32
4.1.	MEIOS DE CULTURA	33
4.2.	INOCULO DOS MICRORGANISMOS	34
4.3.	DILUIÇÕES DOS MICRORGANISMOS	34
4.4.	LEITORES DE MICROPLACA	35
4.5.	EQUIPAMENTO	36
4.6.	MENSURAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA CFU	36
4.7.	ESTATÍSTICA	37
5.	RESULTADOS	37
5.1.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM <i>C. ALBICANS</i>	38
5.2.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	39
5.3.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM <i>PSEUDOMONA AERUGINOSA</i>	41
5.4.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	43
5.5.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM <i>STREPTOCOCCUS SOBRINUS</i>	45
5.6.	COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	47
5.7.	GRUPO CONTROLE (CT)	49
6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
8.	REFERENCIAS	55

RESUMO

Contexto: Substâncias químicas auxiliares são necessárias para reduzir a carga microbiana dos sistemas de canais radiculares. Ao longo do tempo, diversos agentes químicos têm sido preconizados para este propósito. Uma substância ideal ou associações delas deve eliminar bactérias, dissolver tecido necrótico, lubrificar o canal, remover a *smear layer* e não irritar os tecidos saudáveis. Diferentes substâncias químicas auxiliares têm sido propostas e utilizadas, entre os quais o uso de hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações entre 0.5 y 5.25% para preparo químico-mecânico dos canais radiculares figura como conduta clinicamente aceitável e altamente eficaz. Deve-se ressaltar, no entanto, que o NaOCl é um agente muito cáustico, inespecífico e citotóxico, outra solução usada na endodontia é a clorexidina (CHX), pois possui uma ampla gama de atividade antimicrobiana, substantividade (atividade antimicrobiana residual) e citotoxicidade mais baixa do que NaOCl, mas não apresenta capacidade de dissolução do tecido. Nesse sentido, agentes fitoterápicos estão sendo estudados como substâncias auxiliares alternativas, devido aos efeitos adversos desses agentes. Recentemente foi lançado ao mercado um produto que tem propriedades que o tornam candidato como substância auxiliar elaborada com óleos naturais de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)*. Esse óleo possui propriedades antibacteriana, antiviral e antifúngica e, ainda, analgésica.

Objetivo: O Objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar e comparar a atividade antibacteriana e antifúngica da associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* contra cinco cepas bacterianas e uma fúngica em estado planctônico normalmente identificadas no sistema de canais.

Material e métodos: Foram realizados testes em laboratório da solução associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* - Inphloral (fabricado por EMBATEK tecnologia em cosméticos LTDA) comparada com as soluções Hipoclorito 2,5%(NaOCl) (fabricado por ASFER LTDA.) e solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% (CHX) (fabricada por MAQUIRA). As substâncias foram colocadas em contato com as cepas de bactérias: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e o fungo *Candida albicans*. O crescimento bacteriano e do fungo foi determinado por inspeção visual e absorbância usando o espectrofotômetro de microplacas Epoch 2 BioTek.

Resultados: Os resultados mostraram efeito antibacteriano e antifúngico semelhante para associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* (Inphloral) e hipoclorito 2,5% nos períodos de 1h e 6h de incubação. O grupo solução aquosa de Clorexidina 2% foi estatisticamente menos eficaz principalmente na primeira hora de incubação.

Conclusões: Os extratos da associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* retirados da flora natural mostraram uma boa propriedade antibacteriana e antifúngica sendo tão efetivo quando comparado com o hipoclorito de sódio 2,5% nas mesmas concentrações.

Palavras-chave: Endodontia; irrigantes endodônticos; Hipoclorito de Sódio; Clorexidina; Fitoterapia; *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)*; *Petitgrain (citrus aurantium)*.

ABSTRACT

Context: Auxiliary chemical substances are needed to reduce the microbial load of root canal systems. Over time, several chemical agents have been recommended for this purpose. An ideal substance or their combinations should kill bacteria, dissolve necrotic tissue, lubricate the canal, remove the smear layer and not irritate healthy tissue. Different auxiliary chemical substances have been proposed and used, among which the use of sodium hypochlorite (NaOCl) at concentrations between 0.5 and 5.25% for chemical-mechanical preparation of root canals is a clinically acceptable and highly effective approach. It should be noted, however, that NaOCl is a very caustic, nonspecific and cytotoxic agent, another solution used in endodontics is chlorhexidine (CHX), as it has a wide range of antimicrobial activity, substantivity (residual antimicrobial activity) and cytotoxicity lower than NaOCl, but has no tissue dissolving capacity. In this sense, herbal agents are being studied as alternative auxiliary substances, due to the adverse effects of these agents. A product was recently launched on the market that has properties that make it a candidate as an auxiliary substance made with natural *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* oils. This oil has antibacterial, antiviral, antifungal and analgesic properties.

Objective: The objective of this in vitro study was to evaluate and compare the antibacterial and antifungal activity of the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* essential oils against five bacterial strains and one fungal in planktonic state normally identified in the channel system.

Material and methods: Laboratory tests were performed on the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* essential oils - Inphloral (manufactured by EMBATEK cosmetics technology LTDA) solution compared with the solutions Hypochlorite 2.5 (NaOCl) (manufactured by ASFER LTDA.) and 2% chlorhexidine gluconate (CHX) aqueous solution (manufactured by MAQUIRA). The substances were placed in contact with bacterial strains: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* and the fungus *Candida albicans*. Bacterial and fungal growth was determined by visual inspection and absorbance using the Epoch 2 BioTek microplate spectrophotometer.

Results: The results showed a similar antibacterial effect for the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* essential oils and 2.5%

NaOCl in the 1h and 6h incubation periods. The 2% Chlorhexidine aqueous solution group was statistically less effective mainly in the first hour of incubation.

Conclusions: The extracts of the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* essential oils taken from the natural flora showed a good antibacterial and antifungal properties, being as effective when compared with 2.5% sodium hypochlorite.

Keywords: Endodontics; endodontic irrigants; Sodium hypochlorite; Chlorhexidine; Phytotherapy; Tea tree (*Melaleuca alternifolia*); Petitgrain (*citrus aurantium*)

1. INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento de canal radicular é prevenir ou curar processos infecciosos e inflamatórios no sistema de canais radiculares que podem se estender à região periapical. Portanto, microrganismos que invadiram o sistema de canais radiculares devem ser removidos para facilitar o reparo [1]. Em geral, o objetivo de qualquer estratégia de desinfecção na área da saúde é reduzir a carga bacteriana a um nível subcrítico para que a resposta imunológica do paciente permita a cura [2,3]. O tratamento do canal radicular não é diferente onde a desinfecção do canal radicular é considerada o pivô desta terapia [2,3].

O conhecimento anatômico da cavidade pulpar e de seus canais radiculares é um pré-requisito para qualquer tratamento endodôntico; conseqüentemente, o conhecimento inadequado ou a falta dele, acarretam complicações durante a terapia endodôntica, prolongando o período de tratamento, podendo até criar um problema ainda maior do que o inicial [4]. Para tratar a morfologia dos canais radiculares, é necessário ter em mente que a raiz de um dente não possui apenas um ou dois canais, mas o canal pode ser dividido em numerosos canais laterais e acessórios (ramos). O conceito de "canal radicular" deve, portanto, ser substituído pelo termo "sistema de canais radiculares" [4]. Estudos demonstraram que a morfologia radicular e do canal variam muito entre as populações, dentro das populações e até para o mesmo indivíduo [3]. Estudos demonstraram que parte do espaço do canal radicular frequentemente permanece intocada durante o preparo quimicomecânico, independentemente da técnica e dos instrumentos empregados [5]. As áreas intocadas podem conter bactérias e substrato de tecido necrótico, embora a obturação do canal radicular pareça ser radiograficamente adequada [6].

O sucesso do tratamento endodôntico, em grande medida, depende da redução ou eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares. Para tanto, o uso de soluções auxiliares com propriedades antimicrobianas e antifúngicas adequadas durante o desbridamento e preparo do canal são considerados de extrema importância [1].

1.1. JUSTIFICATIVA

De todas as substâncias utilizadas atualmente, o hipoclorito de sódio (NaOCl) parece ser o ideal, pois cobre mais requisitos para irrigante endodôntico do que qualquer outro composto conhecido. Mas existem ainda, algumas preocupações no que diz respeito aos efeitos nocivos do NaOCl, como por exemplo o potencial corrosivo e as reações alérgicas [1].

Outro dos irrigantes frequentemente utilizado na endodontia é o digluconato de Clorexidina (CHX) 2%, a CHX não possui algumas das características indesejáveis do Hipoclorito de Sódio, no entanto, não tem capacidade de dissolver tecidos e, portanto, não pode substituir o hipoclorito de sódio, embora as bactérias possam ser mortas pela CHX, o biofilme e outros resíduos orgânicos não são removidos por ela, portanto, não pode ser usado como a única solução de irrigação [7].

Soluções fitoterápicas podem ser interessantes substitutos para os agentes irrigadores conhecidos pois na medicina e na odontologia têm sido utilizados como agentes anti-inflamatórios, antibióticos, analgésicos e sedativos. Nos últimos anos, no campo da periodontia e endodontia, vários extratos de plantas como própolis, fruta noni, raiz de bardana e folha de nim têm sido usados como medicamentos intracanal com excelentes resultados, abrindo uma nova função para agentes fitoterápicos na terapia odontológica global [8].

1.2. OBJETIVO

Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosas*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus sobrinus* e antifúngica sobre *Candida albicans*, na forma planctônica da associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* comparada ao hipoclorito de sódio 2,5% e solução aquosa de digluconato de clorexidina 2%.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

O tratamento eficaz do canal radicular e a cirurgia endodôntica requerem um conhecimento profundo da anatomia do dente e da morfologia do canal radicular para que os microrganismos e o tecido pulpar possam ser acessados e removidos e as extremidades das raízes manejadas de maneira adequada [9].

Desde os primeiros trabalhos de Hess e Zurcher [10] até nos estudos mais recentes foi demonstrado as complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares e foi estabelecido que a raiz com um canal estreito e um único forame apical é a exceção e não a regra. Os investigadores encontraram forames múltiplos, deltas, canal acessório e outras irregularidades na maioria dos dentes [11]. Kasahara et al., estudaram uma amostra de 510 incisivos centrais superiores extraídos para detalhar seus aspectos anatômicos e descobriram que 60% apresentavam canais acessórios impossíveis de limpar mecanicamente. Um forame apical localizado fora do ápice foi observado em 45% dos dentes [12].

Uma série de estudos envolvendo histologia, transparências, radiografias, impressões, etc., mostraram que o canal principal pode apresentar numerosos ramos, que são nomeados de acordo com sua posição e características:

De acordo com o autor Soares Goldberg: Colateral, lateral ou adventício, secundário, acessório, interduto, canal recorrente, cavo-interradicular, delta apical.

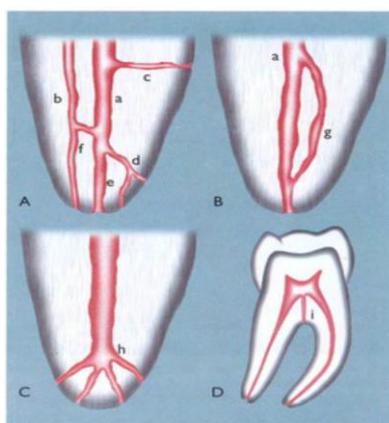


Figura 1. Denominação das ramificações da cavidade pulpar de acordo com Pucci e Reig (ABC) e com Kuttler (D). a) conduto principal; b) colateral; c) lateral; d) secundário; e) acessórios; f) Interduto; g) recorrente; h) Delta apical; i) Cavo-interradicular. Ahmed HMA, Versiani MA, De-Deus G, Dummer PMH. A new system for classifying root and root canal morphology. *Int Endod J.* 2017

Aug.

Nos últimos anos, um volume considerável de dados foi gerado sobre as variações morfológicas nos canais radiculares [14]. Para aumentar a precisão dos métodos anteriormente propostos para a avaliação da anatomia dentária, a micro-TC permitiu a análise tridimensional não destrutiva de canais adicionais, forâmenes múltiplos, deltas apicais, istmos, raízes e canais em C e canais acessórios (Figura 2). Além disso, se obteve dados quantitativos tridimensionais de volume, área de superfície e o índice do modelo de estrutura (SMI); e parâmetros bidimensionais de área, perímetro, diâmetro maior e menor, circularidade e fator de forma do canal radicular [15].

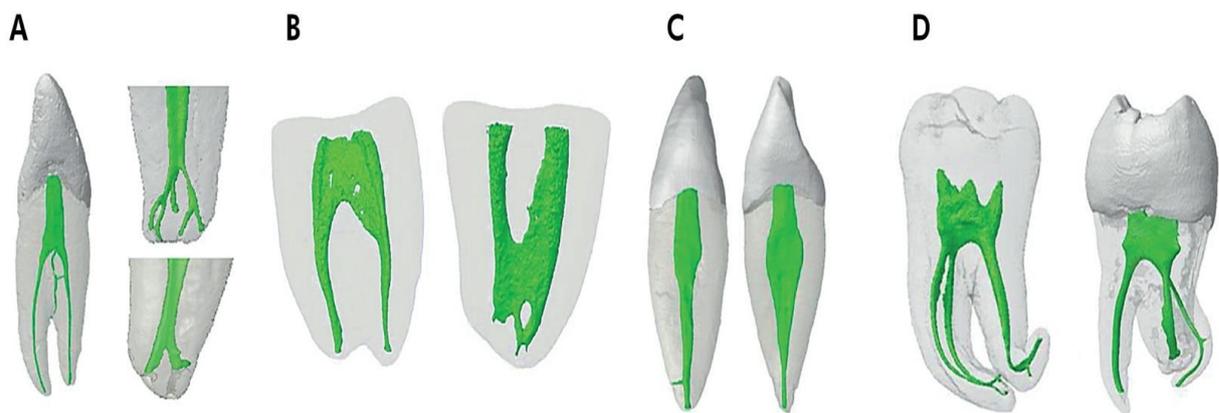


Figura 2. Modelos tridimensionais do sistema de canais radiculares de dentes humanos obtidos por tomografia microcomputarizada mostrando a importância do diagnóstico dos desafios anatômicos antes do preparo biomecânico do sistema de canais radiculares. (A) Presença de canais acessórios e laterais e deltas apicais. (B) Istmo. (C) Canais achatados. (D) Presença de curvaturas moderadas e severas. Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YC, et al. Root canal preparation using micro-computed tomography analysis: a literature review. Braz Oral Res. 2018 Oct.

Devido à complexidade do sistema de canais apresentadas acima, é difícil conseguir uma limpeza e desinfecção completas do canal radicular pelo qual os principais fatores associados à falha endodôntica são a persistência de infecção microbiana no sistema de canais radiculares e / ou na área perirradicular [16].

2.2. OS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS SISTEMAS DE CANAIS RADICULARES

Os agentes microbianos tendem a penetrar na estrutura dentária e se acumular nos canalículos dentinários, a uma profundidade considerável, onde provavelmente produzem biofilmes endodônticos e dificilmente são alcançados por

instrumentos endodônticos e irrigantes [17], especialmente em casos de anatomia complexa, canais laterais e ramificações apicais [18-19]. Os microrganismos que colonizam o sistema de canais radiculares desempenham um papel essencial na patogênese das lesões perirradiculares [20].

Kakehashi et al. (1965) expôs as polpas dentárias de ratos contaminados, denominados convencionais, e livres de germes e relataram que necrose pulpar e lesões perirradiculares se desenvolveram apenas em ratos com microbiota oral. Em um estudo sobre dentes de macaco, Möller et al. (1981) demonstraram que apenas polpas desvitalizadas que estavam infectadas induziam lesões perirradiculares, enquanto polpas desvitalizadas e não infectadas apresentavam ausência de alterações patológicas nos tecidos perirradiculares. Sundqvist (1976) confirmou o importante papel das bactérias nas lesões perirradiculares em um estudo com dentes humanos, no qual as bactérias só foram encontradas em canais radiculares de dentes despulpados com destruição óssea perirradicular [21]. Em dentes infectados, as bactérias podem persistir não apenas em áreas de difícil alcance, como istmos, ramificações, túbulos dentinários e recessos de canais em forma de C ou ovais / achatados, mas também em áreas da parede do canal principal que permanecem intocadas por instrumentos [11]. Estudos de cultivo demonstraram que a microbiota de infecções intrarradiculares persistentes ou secundárias associadas à falha do tratamento endodôntico, ao contrário das infecções primárias, geralmente é composta de apenas uma ou duas espécies [21, 22]. Bactérias gram positivas facultativas, particularmente *Enterococcus faecalis*, são as predominantes. Fungos também podem ser encontrados, em frequências significativamente maiores quando comparadas às infecções primárias [23].

Nas infecções primárias, os organismos comumente isolados são bastonetes gram-negativos anaeróbios (*Fusobacterium nucleatum*, *Cambylobacter rectus*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella* e *Porphyromonas spp.*), Espiroquetas (*Treponema spp.*), Cocos e bastonetes gram-positivos anaeróbios e facultativos (*Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*) [24,25]. Cocos e bastonetes anaeróbicos facultativos gram-positivos, como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, espécies de *Actinomyces* dominam a microflora na doença pós-tratamento. A proporção de espécies de *Lactobacillus* e bastonetes gram-negativos

anaeróbios é menor do que na infecção primária. Além disso, bastões entéricos foram isolados frequentemente de canais radiculares em periodontites apicais [24,26]. As espécies de fungos também foram isoladas com relativa frequência de dentes com periodontite apical, especialmente em infecções persistentes, mesmo em 5-20% dos casos. O achado mais geral de espécies de fungos é *C. albicans*. *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são isolados em uma extensão inferior [27].

Outros Micro-organismos nas infecções endodônticas são as arqueias e os vírus, estes foram encontrados em associação às infecções endodônticas [28, 23] mas as bactérias são os principais micro-organismos envolvidos na patogênese da periodontite apical [29, 23].

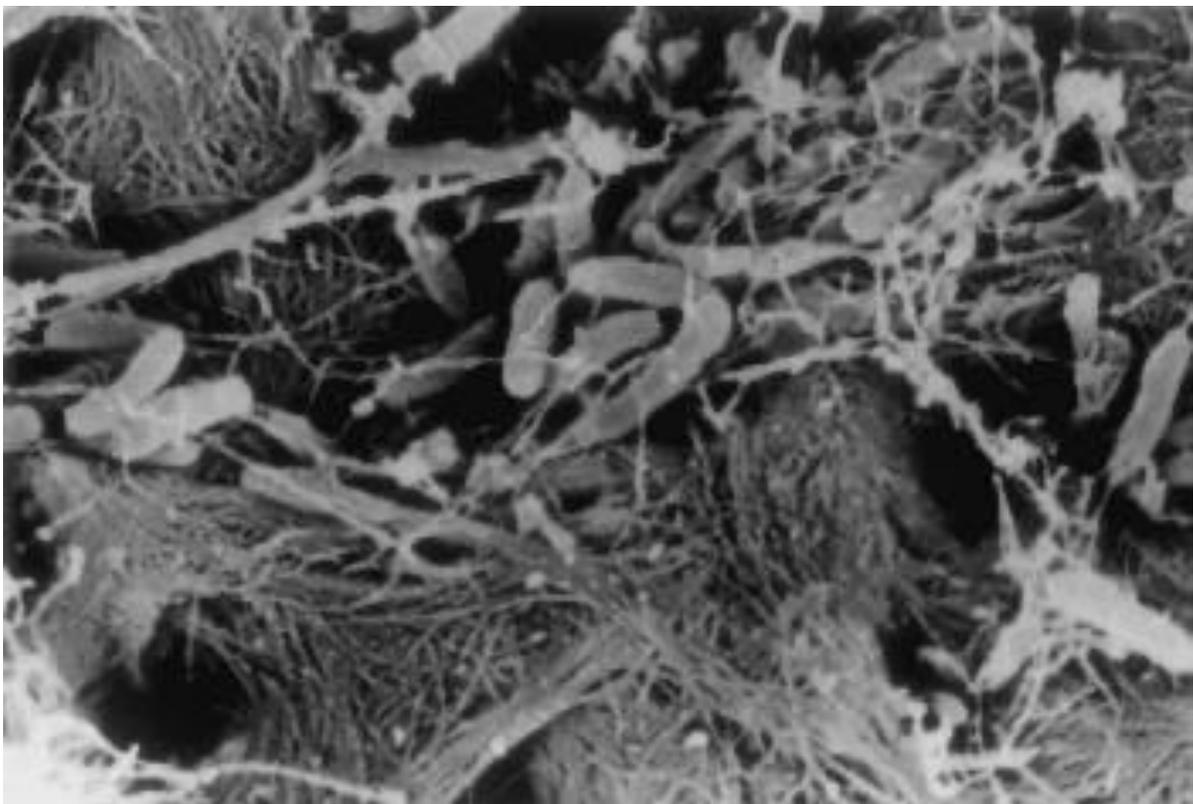


Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura de células bacterianas que colonizam a parede do canal radicular. As bactérias que infectam o sistema de canal radicular são os principais agentes etiológicos da doença perirradicular (ampliação original x 4500). Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J. 2001 Jan.

A microbiota associada aos casos de falha difere marcadamente daquela relatada em dentes não tratados (infecção primária do canal radicular). Enquanto a última é tipicamente uma infecção mista, na qual os bastonetes anaeróbios gram negativos são dominantes, a primeira é geralmente composta por uma ou algumas

espécies bacterianas, geralmente bactérias gram-positivas, sem predomínio aparente de facultativos ou anaeróbios. Möller (1966), após examinar casos falhados, relatou uma média de 1,6 espécies bacterianas por canal radicular. Bactérias anaeróbias corresponderam a 51% dos isolados. *Enterococcus faecalis* foi encontrado em 29% dos casos. Sundqvist et al. (1998) observaram uma média de 1,3 espécies bacterianas por canal e 42% das cepas recuperadas eram bactérias anaeróbias. *E. faecalis* foi detectado em 38% dos canais radiculares infectados. Embora essa bactéria facultativa seja restrita a alguns casos de infecções primárias do canal radicular, geralmente em baixo número, é frequentemente isolada de infecções secundárias e / ou persistentes do canal radicular, geralmente como a única espécie de microrganismo. As cepas de *E. faecalis* demonstraram ser extremamente resistente a vários medicamentos, incluindo hidróxido de cálcio [5,30]. Portanto, quando *E. faecalis* é estabelecido no canal radicular, sua erradicação por meios convencionais pode ser extremamente difícil [31]. Na categoria de infecções endodônticas primárias, o *E. Faecalis* está associado a lesões perirradiculares crônicas assintomáticas com muito mais frequência do que a periodontite perirradicular aguda ou abscessos perirradiculares agudos [32]. A frequência de *E. Faecalis* encontrada em lesões perirradiculares persistentes demonstrou ser muito maior [32]. Os *enterococcus* são importantes patógenos humanos que estão cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos. Esses organismos eram anteriormente considerados parte do gênero *Streptococcus*, mas foram reclassificados em seu próprio gênero, denominado *Enterococcus*. Até o momento, 12 espécies patogênicas para humanos foram descritas, incluindo os isolados humanos mais comuns, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* [35].

Microrganismos semelhantes a leveduras também foram encontrados em canais radiculares de dentes obturados nos quais o tratamento falhou [33]. Isso sugere que eles podem ser resistentes à terapia. Na verdade, foi demonstrado que *Cândida spp.* são resistentes a alguns medicamentos comumente usados em endodontia [34].

2.2.1. *Enterococcus faecalis*

Exibe uma marcada plasticidade genética que lhe permite habitar vários nichos por meio da expressão ou supressão de diferentes genes [36]. Esse

microrganismo sintetiza um grupo heterogêneo de peptídeos antibacterianos ou bacteriocinas, também chamados de enterocinas, que têm particular interesse como agentes bio-conservantes para alimentos [36]. Por outro lado, a presença de enterocinas poderia dar a essas bactérias uma ferramenta ecológica adicional para persistir em ambientes colonizados por microrganismos competidores por nutrientes, com o objetivo de eliminá-los [37].

Enterococcus faecalis apresenta diferentes elementos de virulência que, em conjunto, expressam a capacidade patogênica dessa bactéria. Entre os fatores mais recorrentes citados nas infecções humanas estão a proteína de superfície extracelular (Esp), que promove adesão, colonização e evasão do sistema imunológico, também participa da geração de biofilme e aparentemente desempenha um papel na resistência antimicrobiana; citolisina (Cyl), também chamada de hemolisina, que tem propriedades β -hemolíticas em humanos e é bactericida contra bactérias gram-positivas; gelatinase (Gel) que fornece nutrientes para a bactéria degradando o tecido do hospedeiro e também tem algum tipo de função na formação de biofilme; hialuronidase que atua despolimerizando a molécula de mucopolissacarídeo do tecido conjuntivo, o que facilita a disseminação da bactéria; Os determinantes de feromônios (Eep) são capazes de modular significativamente a resposta inflamatória in vivo; o antígeno A (EfaA) que está associado à aderência da bactéria tanto às células bióticas quanto às superfícies abióticas, além de participar de certas etapas da formação do biofilme; proteína de superfície celular (Ace) que apresenta forte semelhança com a proteína de mesmo nome produzida por *Staphylococcus aureus*, que tem a capacidade de se ligar ao colágeno e teria um papel na patogênese da endocardite [38]; substância de agregação (Agg) que atua mediando a ligação específica da bactéria ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos, além de aumentar a internalização e a vida intracelular do microrganismo [39]. Pesquisas sobre fatores de virulência de *E. faecalis* que contribuem para o entendimento de sua biologia patogênica têm permitido a detecção de diversos fatores que participam da virulência dessa bactéria [40].

Essas características de virulência e outras também foram identificadas em isolados clínicos de *E. faecalis* de infecções endodônticas persistentes e assintomáticas dos canais radiculares e da cavidade oral. [41]. Sua prevalência em tais infecções varia de 24 a 77% [42].

Assim as características mais importantes de *E. faecalis* são sua alta adaptabilidade em condições ambientais adversas e seu potencial desenvolvimento de resistência a antibióticos [38,39].

2.2.2. *Candida Albicans*

Alguns estudos avaliaram a presença de *Candida albicans* e outros microrganismos em dentes com ou sem lesões periapicais e foi demonstrado que os fungos têm um papel importante na falha do tratamento endodôntico e a *Candida albicans* tem um papel maior na falha do que outros microrganismos [23].

A *Candida albicans*, expressa vários fatores de virulência que contribuem para a patogênese. Esses fatores incluem biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro (adesinas), morfogênese (a transição reversível entre células de levedura unicelulares e filamentosas, formas de crescimento), aspartil proteases secretadas e fosfolipases. Além disso, a 'troca fenotípica' é acompanhada por mudanças na expressão do antígeno, morfologia da colônia e afinidades do tecido em *C. albicans* e vários outros *Candida spp.* A troca pode fornecer às células uma flexibilidade que resulta na adaptação do organismo às condições hostis impostas não apenas pelo hospedeiro, mas também pelo médico que trata a infecção [43].

Uma revisão sistemática e meta-análise mostraram que *Candida albicans* é o fungo mais comumente isolado de canais radiculares infectados, seguido por *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii* e *Candida etchellsii* [44], *C. albicans* se liga a superfícies bióticas e abióticas, como próteses e dentina. É dentinofílica e coloniza as paredes dentinárias dos canais radiculares, penetrando nos túbulos dentinários e formando biofilmes (Figura 4). As células redondas de *C. albicans* se fixam às superfícies da dentina por 60-90 min [45-46] e, em seguida, proliferam para formar uma camada basal de biofilme que amadurece em 24 h. *C. albicans* dentro dos biofilmes é 10–100 vezes mais resistente às respostas imunes do hospedeiro e ao tratamento antifúngico, porque o crescimento celular e o metabolismo são retardados e protegidos por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e fatores de proteção [47,46].

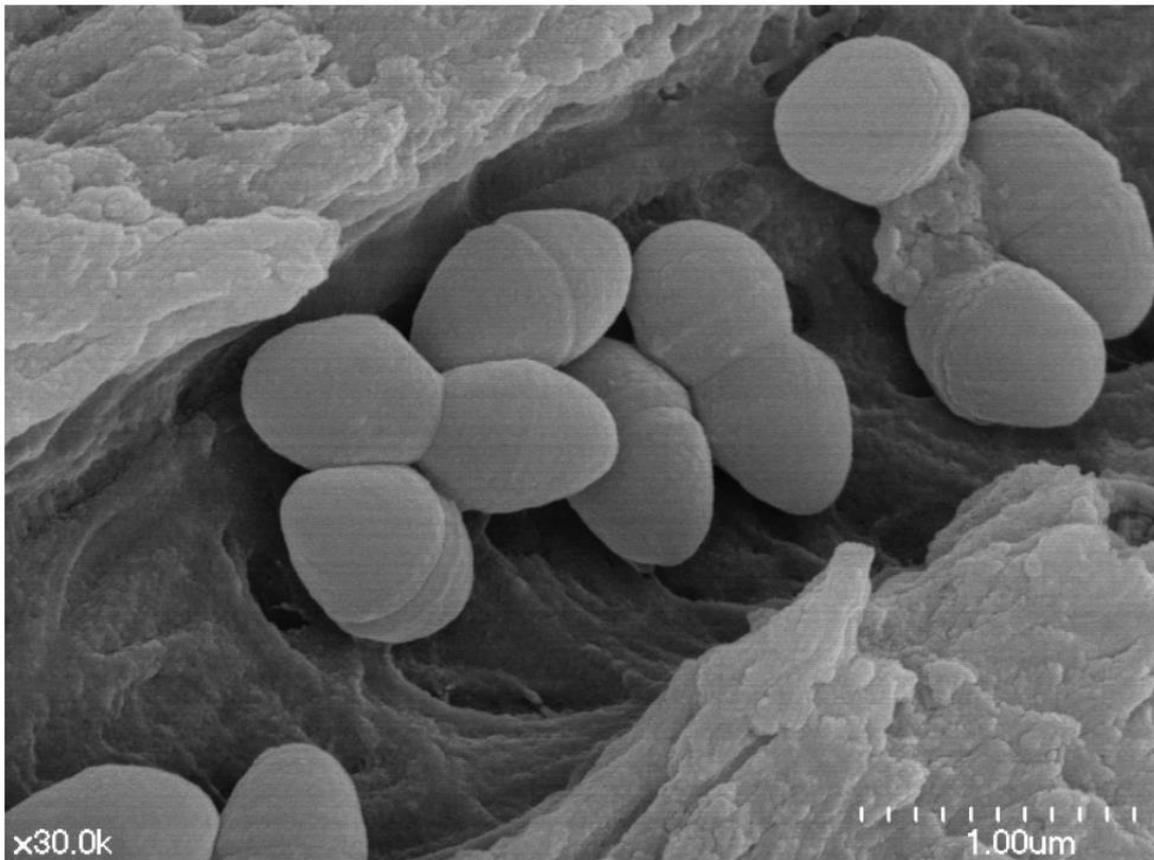


Figura 4. Visão de microscopia eletrônica de varredura da penetração de células de *Candida albicans* nos túbulos dentinários após infecção de 3 semanas em bloco de dentina radicular humana. Blastosporos e células mostrando formação de tubo germinativo (30,000x). Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. *Candida albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. *Microorganisms*, 2020 Aug.

C. albicans pode interagir com uma série de bactérias diferentes de várias maneiras. Curiosamente, *E. faecalis* demonstrou incorporar-se a biofilmes de *C. albicans*, aderindo a formas de levedura e hifas [48]. As bactérias aderem preferencialmente às hifas em oposição às células de levedura [49]. Um modo potencial pelo qual essa interação pode favorecer a resistência ao tratamento é por meio do aumento da penetração do túbulo dentinário. *Enterococcus faecalis* é capaz de penetrar profundamente nos túbulos dentinários [5,41]. Pode ser possível que *E. faecalis* se fixe às hifas de *C. albicans*, que por sua vez demonstraram penetrar nos túbulos [50], proporcionando assim uma oportunidade de invadir e se disseminar na dentina (Figura 5).

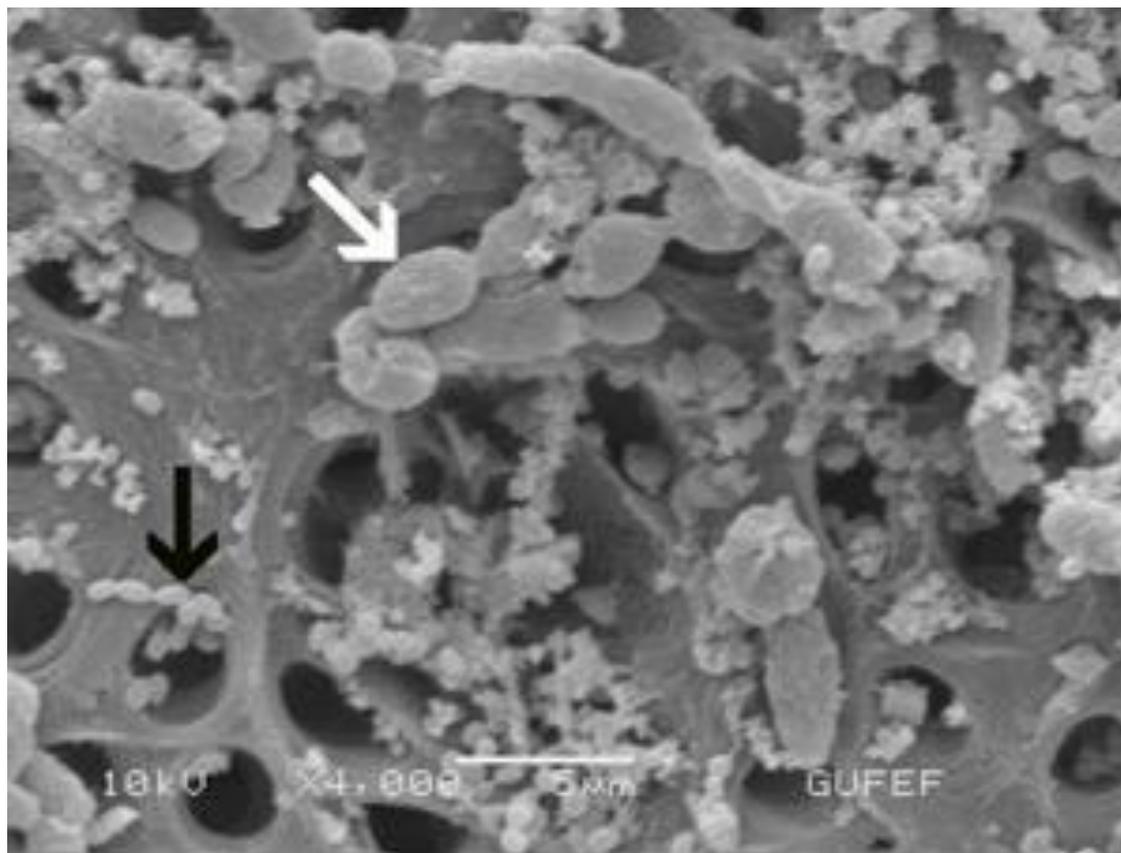


Figura 5. Fotomicrografia de canais radiculares contaminados com *E. faecalis* (seta preta) e *C. Albicans* (seta branca). (x4000). Tirali RE, Bodur H, Ece G. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octenidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2012 May.

Este modelo de melhorar o comportamento invasivo das bactérias não é sem precedentes. Foi estabelecido que o *Staphylococcus aureus* se liga especificamente às hifas de *candida*. Elementos invasivos de hifas de *C. albicans* facilitam a invasão através das barreiras mucosas, levando à disseminação sistêmica [51,52].

2.2.3. *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto de Cocos Gram positivos, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, agrupados em células isoladas, aos pares, tétrades, cadeias curtas ou formando cachos de uvas. Ogston introduziu o nome *Staphylococcus*, do grego staphyle que significa cacho de uvas, para descrever os cocos responsáveis pela inflamação e supuração. São bactérias imóveis, não esporuladas, não têm cápsula, embora existam algumas cepas que desenvolvem uma cápsula de limo, são anaeróbios facultativos. A maioria dos estafilococos produz

catalase (uma enzima capaz de quebrar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio livre); característica que é usada para diferenciar o gênero *Staphylococcus* dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* que são catalase negativa [53].

Em um estudo, Sunde et al. [54] estudaram a microbiota periapical de 36 lesões perirradiculares persistentes por meio de culturas anaeróbias e análise de microscópio eletrônico. Neste trabalho, um total de 148 colônias microbianas e 67 espécies foram detectadas. Microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos foram isolados, dentre eles *Staphylococcus* foram encontrados: *Staphylococcus aerus*, *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus Capitis*, *Staphylococcus epidermis*, etc.

2.2.4. *Streptococcus mutans*

É um coco gram-positivo que foi isolado e identificado por Clarke em 1924 em lesões de cárie em humanos. Ele o chamou de *S. mutans* por causa das formas mutantes em que ocorre: coccobacillus (formato oval) em meio ácido e coco (formato redondo) em meio alcalino [55], é um produtor rápido de ácido láctico, não móvel, catalase-negativo, de cadeia ordenada, com a capacidade de mudar um meio de pH 7 para pH 4,2 em aproximadamente 24 horas. Fermentador de glicose, lactose, rafinose, manitol, inulina e salicina com produção de ácido [56].

Embora a composição da microbiota associada com infecções endodônticas secundárias / persistentes seja diferente em número e diversidade de espécies quando comparada com infecções primárias, *S. mutans* é freqüentemente encontrado em ambos os tipos de infecção [57, 58]. No entanto, as características fisiopatológicas das cepas de *S. mutans* que residem nesses locais são amplamente desconhecidas.

2.2.5. *Pseudomonas Aeruginosa*

É um organismo ambiental Gram negativo comum [59]. *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno onipresente, oportunista e razoavelmente persistente no meio ambiente. Esta bactéria tem a forma de bastonete com aproximadamente 0,5-1 µm de diâmetro e 1,5-5 µm de comprimento [60]. Eles têm um flagelo polar que lhes dá a mobilidade necessária [60].

Uma característica do gênero *Pseudomonas* é a formação de biofilmes e corantes fluorescentes e produção de sideróforos. [59]. Em circunstâncias

particulares, *P. aeruginosa* pode ser um fator patogênico significativo de infecções graves e frequentemente oportunistas em humanos. [59]. *P. aeruginosa* é o colonizador mais frequente de dispositivos médicos (cateteres, nebulizadores, umidificadores) e é um dos patógenos que causam infecções nosocomiais, como pneumonia associada à ventilação mecânica, meningoencefalite e sepse [61]. O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pode ser difícil devido à sua resistência natural e adquirida aos antibióticos [62].

Pseudomonas aeruginosa exibe muitos mecanismos de resistência, incluindo enzimas modificadoras de antimicrobianos, como β -lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, aquisição de plasmídeos que codificam genes de resistência, permeabilidade limitada para antimicrobianos e a capacidade de gerar uma bomba dependente de energia fora da bactéria. [63].

Na figura a seguir são apresentados alguns microrganismos presentes nas infecções primárias assintomáticas e casos de retratamento assintomáticos.

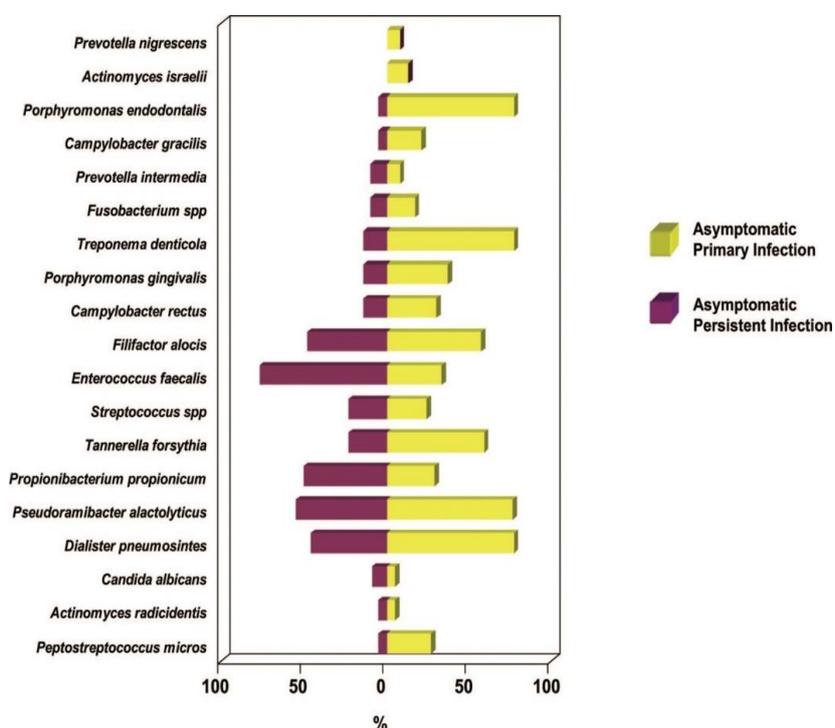


Figure 6. Comparação de microrganismos em infecções primárias assintomáticas e casos de retratamento assintomáticos. Of the taxa investigated, only *E. faecalis* and *P. propionicum* were significantly associated with retreatment cases. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. J Endod., 2005 Jul;31.

Deve ser mantido em mente que a anatomia complexa do canal radicular apresenta dificuldades adicionais porque biofilmes de microrganismos persistentes dentro dos canais radiculares também podem estar localizados nas paredes de ramificações e istmos [64].

Assim em todos os casos em que bactérias viáveis permanecem no sistema de canais radiculares, existe um risco constante de perpetuar a inflamação perirradicular [35].

3. AS SOLUÇÕES AUXILIARES

Como relatado anteriormente, o sucesso do preparo dos canais radiculares pode ser fortemente afetado por sua grande variabilidade anatômica. Substâncias auxiliares são necessárias para erradicar a microbiota e, ao longo do tempo, uma variedade de soluções químicas tem sido desenvolvida para este propósito. Um irrigante ideal ou uma combinação deles devem ser capazes de eliminar bactérias, dissolver tecido necrótico, lubrificar o canal, remover a *smear layer* e não irritar tecidos saudáveis [11].

Atualmente, as duas soluções mais utilizadas como irrigantes na odontologia são o hipoclorito de sódio e a clorexidina, no entanto, eles possuem algumas desvantagens que os fitoterápicos não possuem.

3.1. Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um agente químico comumente utilizado como irrigante de canal radicular na terapia endodôntica devido às suas ações antimicrobianas e capacidade de dissolução de tecidos [65].

O hipoclorito de sódio neutraliza os aminoácidos formando água e sal (reação de neutralização). Com a saída dos íons hidroxila, ocorre redução do pH. O ácido hipocloroso, substância presente na solução de hipoclorito de sódio, quando em contato com o tecido orgânico atua como solvente e libera cloro que, combinado com o grupo amino da proteína, forma cloraminas (reação de cloraminação) que interferem no metabolismo celular. Ácido hipocloroso (HOCl-) e íons hipoclorito (OCI-) levam à degradação de aminoácidos e hidrólise [66].

O hipoclorito de sódio (NaOCl), um composto halogenado, é rotineiramente usado para irrigar o canal radicular durante os tratamentos endodônticos. Possui ação antimicrobiana [67], tem a capacidade de dissolver resíduos pulpares [68] e

componentes orgânicos da dentina (ou seja, ação proteolítica inespecífica) [69]. Ele também tem a capacidade de neutralizar parcialmente os tecidos necróticos ou quaisquer componentes antigênicos ou microbianos deixados no espaço do canal radicular [70] e remover todos os remanescentes pulpare e predentina nas superfícies não instrumentadas [71].

Vários estudos *in vitro* foram realizados sobre a atividade antibacteriana do NaOCl. Walker, em 1936, introduziu o uso de solução de soda clorada de dupla força (NaOCl 5%) como irrigante de canal radicular na prática endodôntica, que continuou em todo o mundo desde então, sem nenhum estudo mostrando definitivamente qualquer outro irrigante mais eficaz [72].

Em 1820, hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo de 2,5%, foi elaborado e recomendado por Labarraque para prevenir a febre puerperal e outras doenças infecciosas. Com base nos estudos laboratoriais controlados por Koch e Pasteur, o hipoclorito em seguida ganhou ampla aceitação como um desinfetante até o final do século XIX [73].

Siqueira et al. (1998) [74] compararam a atividade antibacteriana de vários irrigantes contra quatro bactérias anaeróbias pigmentadas de preto e quatro bactérias facultativas por meio de um teste de difusão em ágar. Seus achados mostraram que a eficácia antibacteriana de NaOCl a 4% e NaOCl a 2,5% foi significativamente maior do que outros agentes testados. Em outro estudo, eles mostraram que não houve diferença na atividade antibacteriana de 1%, 2,5% e 5% de NaOCl [75].

Até agora, nenhuma outra solução foi compatível com a eficácia do NaOCl. No entanto, a atividade citotóxica é uma deficiência bem conhecida do NaOCl, que pode causar efeitos agudos de lesão se atingir a área periapical [76].

O uso de NaOCl para preparo biomecânico de canais radiculares é um procedimento clinicamente aceitável e altamente eficaz. Deve-se ressaltar, no entanto, que o NaOCl é um agente muito cáustico, inespecífico, cuja ação não se limita ao tecido necrótico. É citotóxico para todas as células, exceto epitélio altamente queratinizado [77].

Podem surgir algumas complicações com o seu uso, entre as complicações mais frequentes estão: manchas e/ou descoloração da roupa do paciente, danos

oftálmicos, etc. E quando é extravasado pelo ápice causa necrose tecidual, ou queimaduras químicas e complicações neurológicas [77].

O'Hoy et al. (2003), avaliaram o efeito dos procedimentos de limpeza usando NaOCl, e detectou fenômenos corrosivos significativos de NiTi instrumentos expostos a NaOCl 1% por até 10 ciclos de limpeza. No entanto, nenhuma redução significativa de torque na fratura ou número de revoluções para fadiga de flexão foi encontrado [78].

Um outro efeito colateral do NaOCl tem recebido relativamente pouca atenção na literatura endodôntica: o impacto na matriz dentinária. A dentina é composta por aproximadamente 22% de matéria orgânica em peso. A maior parte consiste em colágeno tipo I, que contribui consideravelmente para as propriedades mecânicas da dentina [79]. O hipoclorito de sódio é conhecido por fragmentar longas cadeias de peptídeos e clorar grupos terminais de proteínas; as N cloraminas resultantes são decompostas em outras espécies [76]. Consequentemente, as soluções de hipoclorito podem afetar as propriedades mecânicas da dentina pela degradação dos componentes orgânicos da dentina [80]. Em casos raros, o hipoclorito de sódio pode causar reações alérgicas [81].

Não existe uma concentração universalmente aceita de hipoclorito de sódio para uso como irrigante endodôntico. A ação antibacteriana e de dissolução do tecido aumenta com a concentração, mas é acompanhada por um aumento da toxicidade. É geralmente usado em concentrações que variam de 0,5 a 5,25%, dependendo dos protocolos de diluição e armazenamento de cada médico [82].

3.2. Clorexidina

O digluconato de clorexidina (CHX) tem sido utilizado como agente terapêutico em diversas áreas da odontologia, incluindo periodontia, cirurgia e, mais recentemente, endodontia. O mecanismo de ação da CHX pode ser explicado pela interação química desta substância com as membranas celulares bacterianas. Para uma dose alta a ligação eletrostática entre suas moléculas catiônicas e a parede celular bacteriana carregada negativamente faz com que a CHX exerça uma ação bactericida, resultando em precipitação e coagulação de proteínas citoplasmáticas e, conseqüentemente, morte celular [83].

A clorexidina é amplamente utilizada na desinfecção em odontologia devido à sua boa atividade antimicrobiana [84,85]. É utilizada por ser considerada agente

antimicrobiano de amplo espectro e por ser bastante efetiva contra o *Enterococcus faecalis* além de ser biocompatível. Entretanto, não dissolve tecidos orgânicos o que gera dúvidas em relação a sua capacidade de utilização como irrigante durante a terapia endodôntica. Outras razões são que ela não remove a *smear layer* e não é capaz de inativar os lipopolissacarídeos [86].

O uso de CHX como irrigante endodôntico é restrito, pois pode descolorir os dentes e tem outros efeitos colaterais que incluem perda de paladar, sensação de queimação da mucosa oral, secura subjetiva da cavidade oral e descoloração da língua [86].

Em endodontia, as características de substantividade e efeito residual (consideradas virtudes) podem até ser motivo de preocupação, pois poderiam manter a CHX ou seus subprodutos degradantes nos tecidos do hospedeiro por um longo período de tempo [87].

Portanto, tendo conhecimento das desvantagens dos irrigantes convencionais na endodontia vemos a necessidade de uma substituição por um irrigante mais biocompatível. Para superar essas desvantagens dos irrigantes atualmente conhecidos, sugere-se o uso de alternativas mais biocompatíveis.

3.3. Fitoterápicos

Os produtos fitoterápicos são usados desde os tempos antigos na medicina popular, envolvendo as tradições médicas orientais e ocidentais [88]. Nas últimas décadas, as empresas farmacêuticas têm se interessado em investigar as plantas como fontes de novos fitoterápicos com eficácia, segurança e qualidade comprovadas [88]. Os fitoterápicos são obtidos através de plantas e podem ser utilizados como remédios artesanais sob forma de chás, soluções, comprimidos, dentre outros [89].

Brasil é um país privilegiado em relação ao emprego da fitoterapia, pois possui 25% da flora mundial e um patrimônio genético de grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos [88]. Desde a década de 80, vários documentos vêm sendo elaborados a fim de enfatizar o uso de fitoterápicos na atenção básica no sistema de saúde pública com o intuito de priorizar a melhoria dos serviços, o aumento da resolutividade e o incremento de diferentes abordagens (Matos, 1998).

Por milhares de anos, produtos fitoterápicos ou naturais têm sido usados na prática odontológica e médica e se tornaram ainda mais populares hoje devido à sua alta atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes [81].

O campo da odontologia também começou a explorar as propriedades das ervas com o propósito de aliviar a dor de dente, a inflamação das gengivas e as aftas [89]. Os agentes anti-sépticos, antibacterianos, antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, antivirais e analgésicos derivados de plantas são de amplo interesse em odontologia [90]. Por exemplo, nos últimos anos, no campo da periodontia e endodontia, diversos extratos vegetais como própolis, fruta noni, raiz de bardana e folha de nim têm sido usados como medicamentos intracanal com excelentes resultados, abrindo uma nova função para os agentes fitoterápicos na terapia odontológica global [91].

O tratamento com fitoterápicos apresenta vantagens como custo acessível à população e aos serviços públicos de saúde; fácil manuseio; grande disponibilidade de matéria-prima; excelente aceitação popular devido ao conhecimento dos efeitos terapêuticos das plantas e reações adversas mínimas, quando prescritos e administrados de forma correta. Possui também amplo espectro de ações farmacológicas que incluem atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, ansiolítica, cicatrizante dentre outras [92].

As afecções odontológicas são evidenciadas por sinais e sintomas característicos de diversas doenças, dentre elas as mais comuns são as lesões de cáries, gengivite, estomatite aftosa, herpes simples e candidose. Nesse contexto, a Fitoterapia surge como alternativa de interesse para a complementação do tratamento, sendo que já foram encontradas 132 espécies de plantas capazes de auxiliar no tratamento dessas afecções [87]. O cravo-da-índia, a camomila, a malva, a romã, a unha-de-gato e a própolis possuem ação consubstanciada por testes clínicos e laboratoriais e estão entre os fitoterápicos mais utilizados em Odontologia.

Grandes variedades de agentes antibacterianos sintéticos têm sido usadas ao longo dos anos como substâncias auxiliares endodônticas, mas com a crescente popularidade das medicinas tradicionais e holísticas / alternativas devido à sua origem natural, fácil disponibilidade, eficácia, segurança e menos efeitos colaterais, a literatura descreve diferentes alternativas fitoterápicas disponíveis hoje para uso como irrigantes endodônticos eficazes (Figura 7) [93].



Figura 7. Irrigantes de canal radicular sintéticos versus fitoterápicos. Modificado de Vineet Agrawal MDS, Sonali Kapoor MDS & Isha Agrawal MDS. Critical Review on Eliminating Endodontic Dental Infections Using Herbal Products, Journal of Dietary Supplements (2016).

Na Tabela 1, se apresenta algumas plantas medicinais testadas como substâncias auxiliares no tratamento do canal radicular.

Tabela 1. Plantas medicinais testadas como auxiliares no tratamento do canal radicular.

Autor/ Ano de publicação	Substância principal do fitoterápico	Microrganismos	Emprego	Material	Controle positivo	Atividade antimicrobiana
Kandaswamy et al. 2010	Própolis (Apis melífera L.) Suco de Morinda citrifolia L. (MCJ)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	++CHX, +Ca(OH) ₂ e ***PVPI 2%	Própolis (71%), MCJ (69%)
Prabhakar et al. 2010	Triphala (Embica officinalis, Terminalia bellirica e Terminalia chebula) polifenol do chá verde (Camellia sinensis)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	*MTAD, +++NaOCl 5%	Triphala (100%) em biofilmes de 3 semanas, Polifenol do chá verde diminuição na contagem UFC
Costa et al. 2012	Aroeira-da-praia (Schinus terebintifolius Raddi) Quixabeira (Syderoxylum)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	EDTA, +++NaOCl 2,5%, ++CHX 0,12%	100%
Xie et al. 2012	Berberina (Berberis vulgaris L.)	Nucleato de <i>Fusobacterium tum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Prevotella termedia</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	++CHX 1% e 2%; +++NaOCl 5,25%	Menos eficaz que as substâncias controle

Bhardwaj et al. 2013	Morinda citrifolia L. (MCJ) Aloe Vera (Aloe vera L.) própolis (Apis melífera L.)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	+++NaOCl 1%	Não reportaram
Valera et al. 2013	Óleo de mamona (Ricinus communis L.) Aloe vera (Aloe vera L.) Gengibre (Zingiber officinale)	<i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	+++NaOCl 2,5%; ++CHX 2%	Óleo de mamona 99,9%; Gengibre 99,8% e Aloe vera 87,69%
Jolly et al. 2013	Própolis (Apis melífera L.)	<i>Bactérias aeróbias e anaeróbias</i>	Irrigação	Dentes decíduos (estudo clínico)	++CHX 2%, +Ca(OH) ₂ 4%, 4% de dimetilsulfóxido	Diminuição significativa na contagem das UFC
Tyagi et al. 2013	Própolis (Apis melífera L.) Morinda citrifolia (MCJ) Neem (Azadirachta indica)	<i>Candida Albicans</i>	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	+++NaOCl 5%	Própolis 100%; MCJ 9%; Neem 97%
Mistry et al. 2013	Azadirachta indica, Mimosa pudica, Tinospora cardifolia, Ocimum sanctum	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>S. aureus</i>	Irrigação	Dentes decíduos (estudo clínico)	+++NaOCl	Diminuição significativa na contagem das UFC
Jayahari et al. 2014	Suco de maracujá (Passiflora edulis)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Culturas de bactérias	+++NaOCl 5,25%	100%
Verma et al. 2014	Própolis (Apis melífera L.)	<i>Streptococci</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Escherichia coli</i>	Irrigação	Dentes decíduos (estudo clínico)	Solução salina (controle negativo)	Diminuição significativa na contagem média
Birring et al. 2015	Extrato de alho (Allium sativum L.)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Culturas de bactérias	+++NaOCl 5,25%	Eficácia semelhante a do hipoclorito de sódio 5,25%
Guneser et al. 2016	Salvia officinalis	<i>Enterococcus faecalis</i> .	Irrigação	Dentes permanentes extraídos	+++NaOCl, ++CHX 2%, cloridrato de octenidina	Diminuição significativa na contagem média das UFC
Shah et al. 2016	Soluneem	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irrigação	Culturas de bactérias	+++NaOCl 1%	Eficácia semelhante a do hipoclorito de sódio 5,25%
Dhariwal et al. (2016)	Extratos etanólicos de Curcuma longa Chá verde (Camellia sinensis)	<i>P. intermedia</i> , <i>Porphyromona Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium Peptostreptococcus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Staphylococcus Aureus</i>	Irrigação	Dentes decíduos (estudo clínico)	+++NaOCl	C. longa (cúrcuma) 84,6%; C. sinensis (chá verde) 82,05%
Oliveira et al. 2017	Lamiaceae (R. officinalis L.)	<i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Irrigação	Culturas de bactérias	Não reportaram	100% para C. albicans e P. aeruginosa, redução significativa UFC das demais

+ Ca (OH)₂: Hidróxido de Cálcio ++ CHX: Clorexidina

+++ NaOCl: Hipoclorito de Sódio

* MTAD (DENTSPLY Tulsa Dental, Tulsa, OK, EUA).

Adaptado de: POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FITOTERÁPICOS NA IRRIGAÇÃO E MEDICAÇÃO INTRACANAL: REVISÃO DE LITERATURA; BRUNA KAVAMY SILVESTRE DE OLIVEIRA.

Um exemplo de fitoterápico que está gerando pesquisas como solução auxiliar irrigadora é a associação de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* (Inphloral), por ser um produto 100% natural, sem adição de álcool, flúor ou qualquer substância química, o que o gera não tóxico, comprovado pela International Association for Dental Research (IADR) em Londres e aprovado pela Anvisa e pelo FDA. O Inphloral é elaborado com óleos naturais de *Tea Tree (Melaleuca)* e *Petitgrain*, retirados da flora natural o que proporciona sabor e odor agradável, ele possui propriedades antibacterianas, antiviral e antifúngica além de ser analgésico. Pode ser usado em seres humanos a partir de 6 anos de idade, assim como em pacientes imunodeprimidos que estejam em tratamentos especiais [94].

3.3.1. Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*)

O óleo da árvore do chá *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* é uma planta nativa da Austrália com muitas propriedades, como ser um agente anti-séptico e antifúngico [96]. Ele também tem uma ação de solvente suave, portanto, pode ser de uso potencial na dissolução de tecidos necróticos durante a terapia de canal radicular.

O principal componente ativo do óleo da árvore do chá é o terpinen-4-ol (normalmente 30-40%). Este composto é responsável por suas propriedades antibacterianas e antifúngicas [92]. Em um estudo de Kamath et al. (2013), a eficácia antibacteriana do óleo da árvore do chá foi comparada com hipoclorito de sódio a 3% e clorexidina a 2% contra *E. faecalis*. Verificou-se que a atividade antimicrobiana máxima foi demonstrada por clorexidina a 2% seguida por óleo de melaleuca e hipoclorito de sódio [96].

3.3.2. Óleo essencial Petitgrain (*Citrus aurantium L.*)

O óleo essencial é o subproduto mais vital do processamento de citros. Os óleos essenciais Citrus são usados devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos e antioxidantes [96]. Acredita-se que a

presença de terpenos, flavonóides, carotenos e cumarinas sejam responsáveis pelas fortes atividades antioxidantes e antimicrobianas [97].

O *petitgrain* óleo essencial de laranja mostrou uma notável atividade de eliminação de radicais, superior ao óleo de flor (néroli) e óleo de casca de fruta (laranja amarga) da mesma planta [98,99]. O potente efeito antioxidante pode ser atribuído ao alto teor de d-limoneno. Num estudo o *petitgrain* inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor ramannianus* e *Fusarium culmorum* [100].

A fitoterapia pode trazer muitos benefícios na odontologia, principalmente em relação a soluções irrigadoras. Além de grandes benefícios ao ser humano, possui baixo custo e gera grande efetividade.

A ideia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica para os profissionais da saúde. A oferta de fitoterápicos registrados, com espectro de ação adequado e com indicações terapêuticas definidas, conta com a segurança de um medicamento padronizado e com eficácia garantida [101].

4. METODOLOGIA

O trabalho in vitro foi realizado no laboratório de biologia biomolecular da Universidade de Brasília.

A eficácia da solução de *TeaTree* e *Petitgrain* foi comparada com as soluções hipoclorito 2,5% e clorexidina 2% em 5 bactérias e um fungo. A quantidade de microrganismos foi obtida por meio de análise nefelométrica com uso de espectrofotômetro de massa. Cepas dos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e o fungo *Candida albicans* foram inoculadas em tubos Falcon de 50mL contendo meio Brain Heart Infusion, BHI, para as bactérias e meio Sabouraud Dextrose para o fungo. Os inóculos foram incubados a 37°C durante 18 horas em Shaker (Equipamento de agitação orbital constante).

Após as 18 horas os inóculos foram retirados do Shaker e foram levados para, o fluxo laminar onde em placas de cultura de células de 96 poços estéril foram pipetados 200 µL dos inóculos das bactérias e do fungo, misturadas com a solução teste *Tea Tree* e *Petitgrain* (Inphloral) e as soluções clorexidina 2% (CHX) e

hipoclorito 2,5% (NaOCl) nas diluições de 10%, 25%, 50% e 90%. Todas as bactérias e o fungo não expostos as soluções foram o grupo controle (CT). As placas de cultura foram levadas para o espectrofotômetro de microplacas Epoch 2 BioTek (600nm) a 37 °C, onde foram registradas as curvas de crescimento bacteriano com medições realizadas a cada 30 minutos durante 6 horas. Após as 6 horas os dados foram representados no programa Excel.

As experiências foram repetidas 2 vezes de forma independente para cada bactéria e o fungo.

A tabela a seguir apresenta as cepas de microrganismos utilizados no estudo:

Tabela 2. Bactérias e fungo utilizados no estudo.

Microrganismo	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27843
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
<i>Streptococcus sobrinus</i>	27607
<i>Streptococcus mutans</i>	25175
<i>Candida albicans</i>	10231

4.1. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura foram preparados seguindo as instruções do fabricante.

O preparo do caldo BHI para cultivo das bactérias foi preparado como se apresenta a seguir:

Materiais:

Brain Heart broth ----- 37g
H₂O destilada ----- 1000ml

Método:

Dissolver o BHI na H₂O destilada, agitar bem;
Autoclavar tubos ou garrafas a meia rosca por 15 minutos a 121° C;
Distribuir o BHI caldo estéril nos tubos estéreis.

O preparo do caldo sabouraud para cultivo do fungo, foi preparado como se mostra a seguir: Materiais:

Brain Heart broth ----- 37g
H₂O destilada ----- 1000ml

Método:

Dissolver o BHI na H₂O destilada, agitar bem;

Autoclavar tubos ou garrafas a meia rosca por 15 minutos a 121° C;

Distribuir o BHI caldo estéril nos tubos estéreis.

4.2. INOCULO DOS MICRORGANISMOS

Cepas de bactérias: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27843), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) foram inoculadas em tubos Falcon de 50mL contendo meio Brain Heart Infusion, Code No. IO 119, IONLAB Equipment for Laboratories and Hospitals Ltda. BHI, para as bactérias e meio Sabouraud Dextrose para o fungo.

Foram realizados os pre-inóculos das bactérias e do fungo nas seguintes concentrações:

600 ml de meio BHI + 120 µm do pre-inóculo da bactéria

600 ml de meio Sabouraud + 120 µm do pre-inóculo do fungo

As amostras foram incubadas a 37°C durante 18 horas em Shaker (Equipamento de agitação orbital constante), o crescimento microbiano foi verificado por mudanças na turbidez.

4.3. DILUIÇÕES DOS MICRORGANISMOS

Em placas de cultura de células de 96 poços estéril (TPP ref. 9296, Europe/Switzerland) foram pipetados 200 microlitros dos inóculos das bactérias e do fungo, misturadas com a solução teste de *Tea Tree e Petitgrain* (Inphloral) e as soluções clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, que são as concentrações comumente usadas para irrigação no canal radicular, e foram realizados os testes em diferentes diluições de 10%, 25%, 50% e 90%, em replicados de 2. Todas as bactérias e o fungo não expostos as soluções foram o grupo controle (CT).

Tabela 3. Representação da placa de cultura de células de 96 poços.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle	160 µL meio 40 µL inóculo						200 µL BHI					
		INPHORAL				CLORHEXIDINA 2%				HIPOCLORITO 2,5%			
D	10%	20 µL solução 6 µL Inóculo 174 µL Meio				20 µL solução 6 µL Inóculo 174 µL Meio				20 µL solução 6 µL Inóculo 174 µL Meio			
E	25%	50 µL solução 6 µL Inóculo 144 µL Meio				50 µL solução 6 µL Inóculo 144 µL Meio				50 µL solução 6 µL Inóculo 144 µL Meio			
F	50%	100 µL solução 6 µL Inóculo 94 µL Meio				100 µL solução 6 µL Inóculo 94 µL Meio				100 µL solução 6 µL Inóculo 94 µL Meio			
G	90%	180 µL solução 6 µL Inóculo 14 µL Meio				180 µL solução 6 µL Inóculo 14 µL Meio				180 µL solução 6 µL Inóculo 14 L Meio			

4.4. LEITORES DE MICROPLACA

O crescimento bacteriano e do fungo foi determinado por inspeção visual e absorvância usando o espectrofotômetro de microplacas Epoch 2 BioTek Instruments, Winooski,VT,USA, que faz medições de densidade óptica, com um comprimento de onda de 600nm que é o comprimento de onda tradicional para o crescimento celular, em temperatura de 37°C, com agitação antes de cada ciclo e medições realizadas a cada 30 minutos durante 6 horas, depois das 6 horas foi realizada a coleta de dados da leitura das placas para estabelecer a curva de crescimento no programa Excel. Os experimentos foram repetidos 2 vezes de forma independente.

4.5. EQUIPAMENTO

O monitoramento do crescimento celular é uma ferramenta importante nas ciências biológicas. Leitores de microplacas com controle de temperatura podem processar um grande número de amostras e documentar os efeitos da inibição do crescimento, assim neste estudo foi usado o espectrofotômetro da BioTek Instruments, Winooski, VT, USA., com a capacidade de monitorar curvas de crescimento a 600 nm com controle de temperatura a 37°C.

O Espectrofotômetro de Microplaca Epoch™2 oferece excelente desempenho para medições na faixa de UV-Visível de microplacas de 6 a 384 poços, cubetas e até microvolumes de amostras com as Placas de Microvolume Take3™. A interface de tela de toque opcional facilita a escolha de protocolos predefinidos ou a definição de programas personalizados. Modos de endpoint, cinética, varredura espectral e varredura de área de poço, junto com incubação e agitação, permitem uma ampla variedade de aplicações.

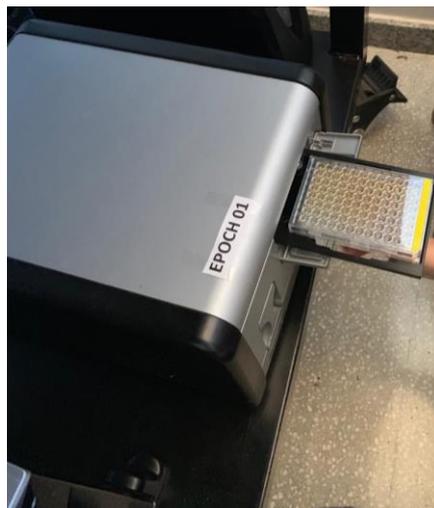


Figura 8. Biotek epoch equipment.

4.6. MENSURAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA CFU

As bactérias e o fungo não expostos as soluções foram diluídas 10^2 e 10^3 e foi pipetado 100 μ L e plaqueadas em placas Petri contendo Brain Heart Infusion Ágar para as bactérias e placas Petri Sabouraud Ágar para o fungo, as placas foram levadas para estufa a 37 °C durante 24 horas, após as 24 horas as placas foram retiradas da estufa e foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) de todas as bactérias e do fungo. Cada placa foi somada, a média aritmética foi calculada e multiplicada pela diluição correspondente.

4.7. ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos foram tabulados em planilhas Excel e submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e análise de varância *One-Way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni (STATA IC 15.1, StataCorp, College Station, Texas, USA). N= 9/grupo, valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

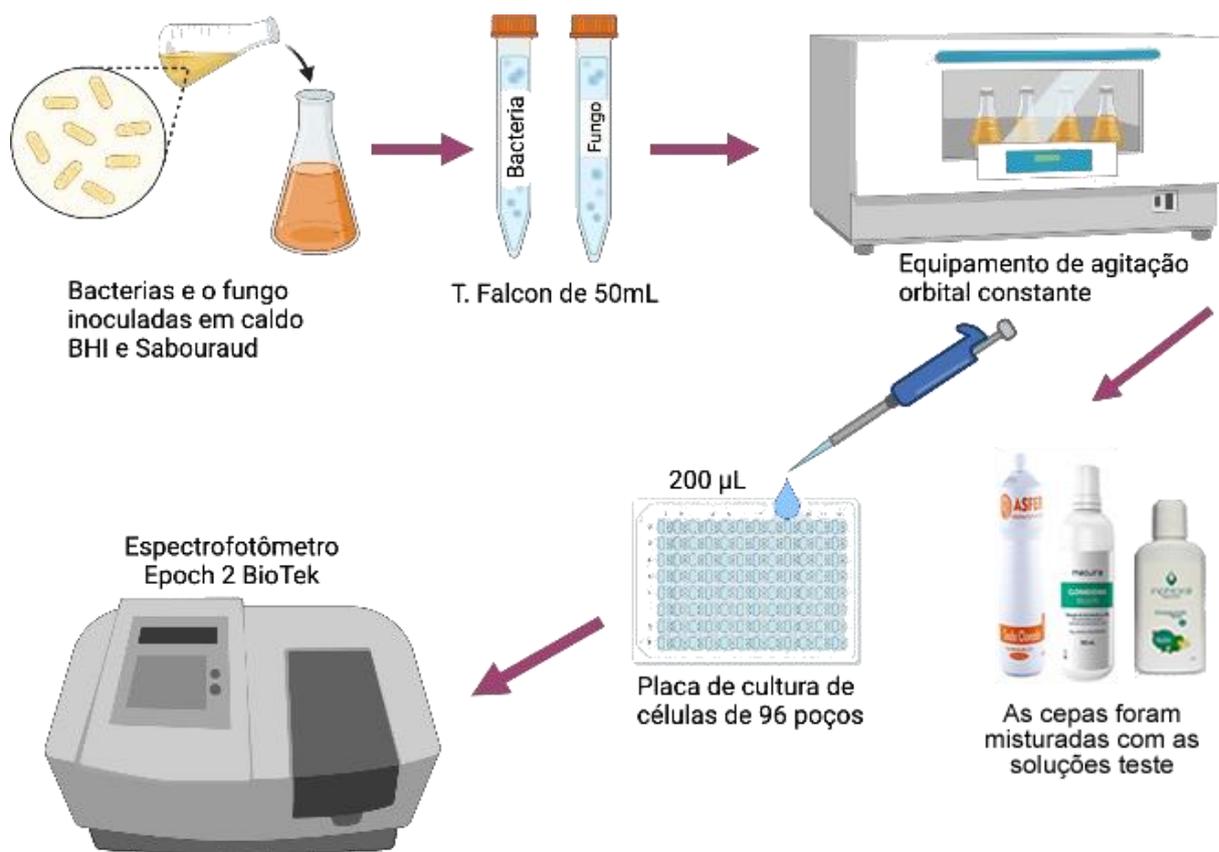


Figura 9. Representação da metodologia realizada no estudo.

5. RESULTADOS

Conforme documentado nos gráficos a seguir, diluições crescentes dos irrigantes foram pipetadas nos poços. Pode se observar que todas as soluções irrigantes reduziram significativamente as contagens dos microrganismos em comparação com o grupo controle que foram os poços não tratados com as soluções e mostraram um aumento uniforme de crescimento.

A seguir se apresenta a comparação das curvas de crescimento das diferentes concentrações de *Tea Tree e Petitgrain* (Inphloral), solução de clorexidina 2% (CHX) e hipoclorito de sódio 2% (NaOCl) nas curvas de crescimento.

5.1. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM *C. ALBICANS*

Na Figura 10, pode se observar que a solução fitoterápica teste nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% teve um efeito fungicida contra a *Candida Albicans* em todas as concentrações, principalmente na primeira hora demonstrando sua eficácia no controle do crescimento do fungo, a concentração na diluição de 90 % foi a mais efetiva tendo um efeito bactericida similar ao hipoclorito de sódio.

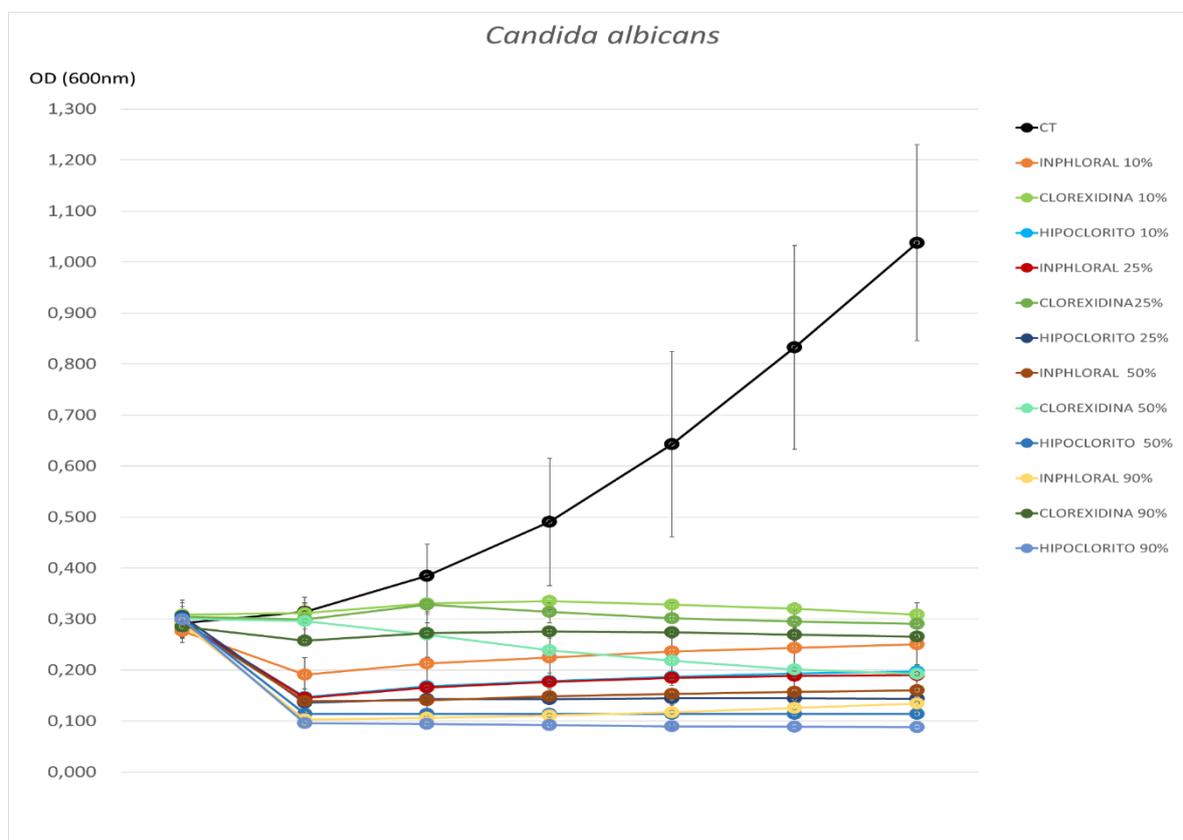
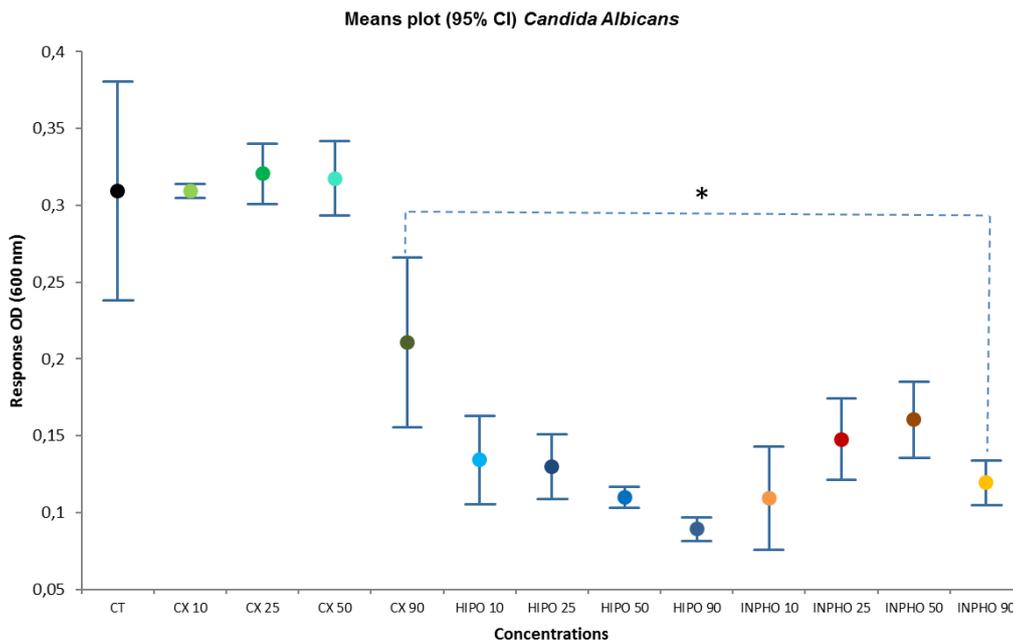


Figura 10. Curvas de crescimento da *C. Albicans* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 6 horas.

Observamos na Figura 11 que a solução de hipoclorito nas concentrações de; 10%, 25%, 50% e 90%, apresentaram maior absorvância, com menor turbidez e, portanto, menor quantidade do fungo *Candida Albicans*, demonstrando assim maior eficácia no controle do crescimento do fungo.



O símbolo “*” indica $p < 0.01$, comparações entre grupos e controle (One Way ANOVA, Bonferroni pós-teste)

Figura 11. Efeito antibacteriano do fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% em *Candida Albicans*.

A concentração mais eficaz contra *C. Albicans* foi o hipoclorito 2% na concentração de 90% com efeito fungicida semelhante à solução fitoterápica na mesma concentração.

5.2. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Na figura 12 pode se observar que a solução fitoterápica teste na concentração de 90% teve um efeito bactericida contra o *Enterococcus faecalis*, semelhante ao hipoclorito 2% na mesma concentração e superior ao hipoclorito na concentração de 50% na primeira hora de exposição e superior à clorexidina em todas as concentrações.

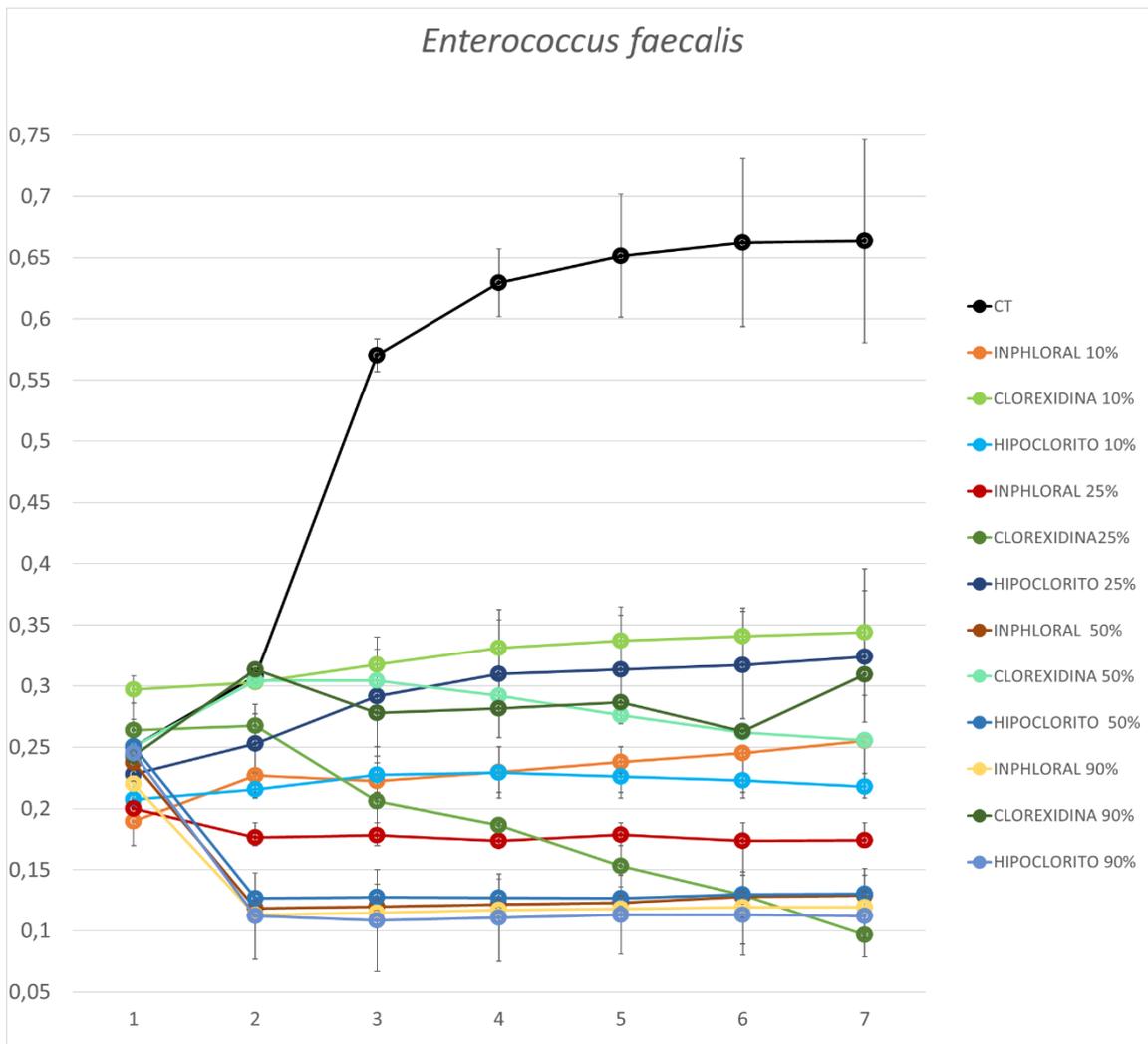
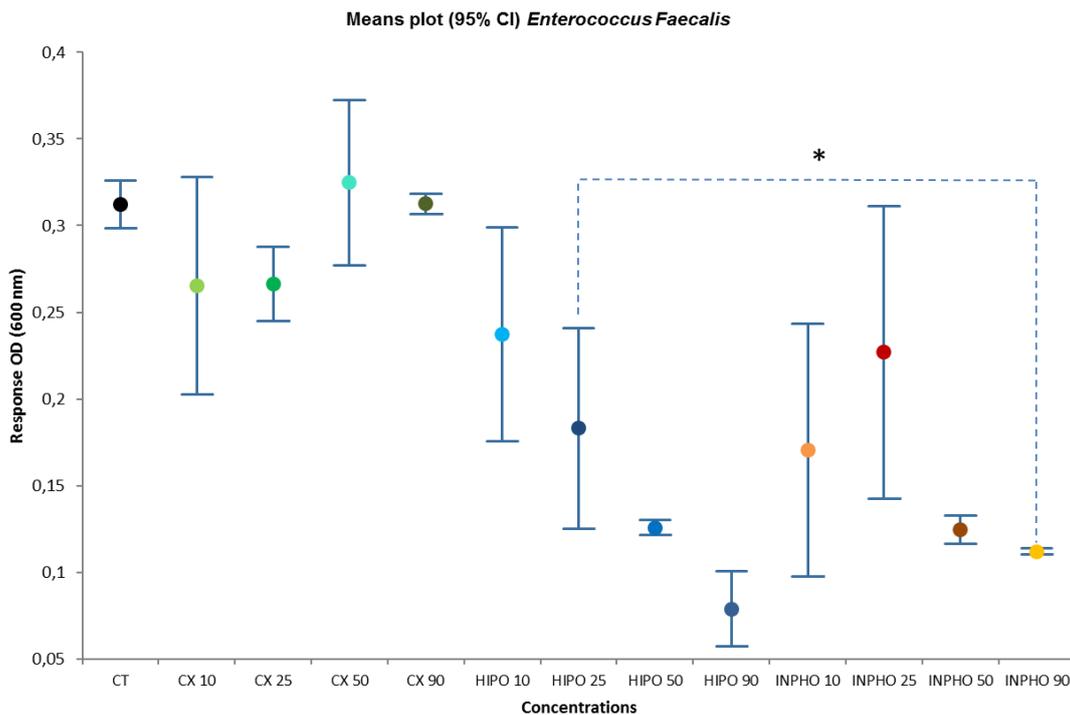


Figura 12. Curvas de crescimento do *Enterococcus faecalis* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 6 horas.

Observa-se que a clorexidina ainda na concentração maior de 90% não teve uma ação bactericida desejável contra o *E. Faecalis*, na primeira hora de exposição, a clorexidina na concentração de 25% teve um efeito bactericida contra *Enterococcus faecalis* após a sexta hora de exposição.



O símbolo “*” indica $p < 0,01$, comparações entre grupos e controle (One Way ANOVA, Bonferroni pós-teste)

Figura 13. Efeito antibacteriano do fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% em *Enterococcus Faecalis*.

Pode-se observar no gráfico que a solução hipoclorito 2% nas concentrações de; 50 e 90% apresentaram maior nível de absorvância, demonstrando sua eficácia no controle do crescimento superior à Clorexidina e quase semelhante à solução fitoterápica nas mesmas concentrações.

5.3. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

Observamos que a solução fitoterápica teste teve um efeito bactericida contra a *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 90% muito semelhante à ação do hipoclorito de sódio na mesma concentração de 90% na primeira hora de incubação e a atividade antibacteriana da solução fitoterápica na concentração de 50% foi superior comparado com o hipoclorito na mesma concentração.

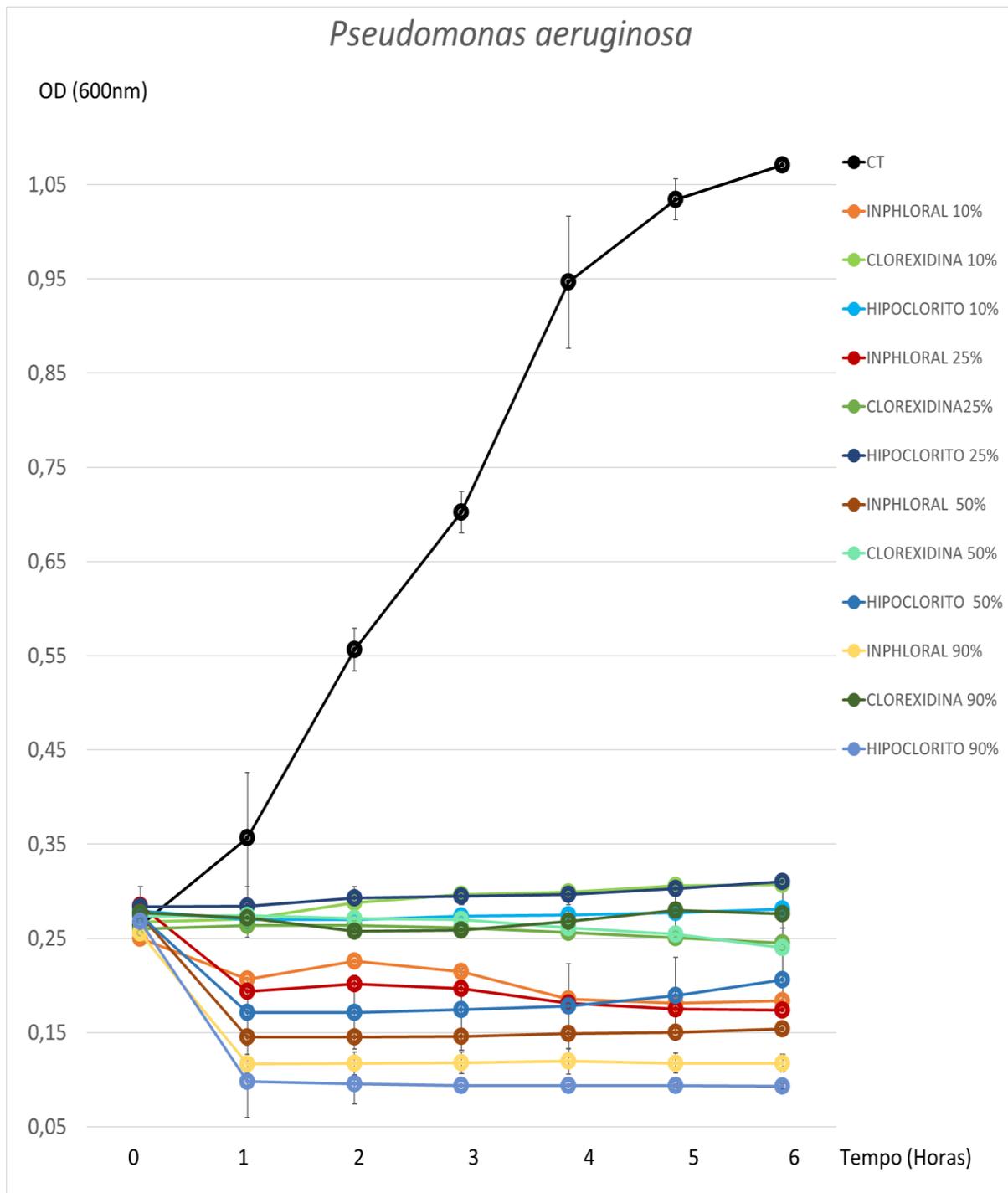
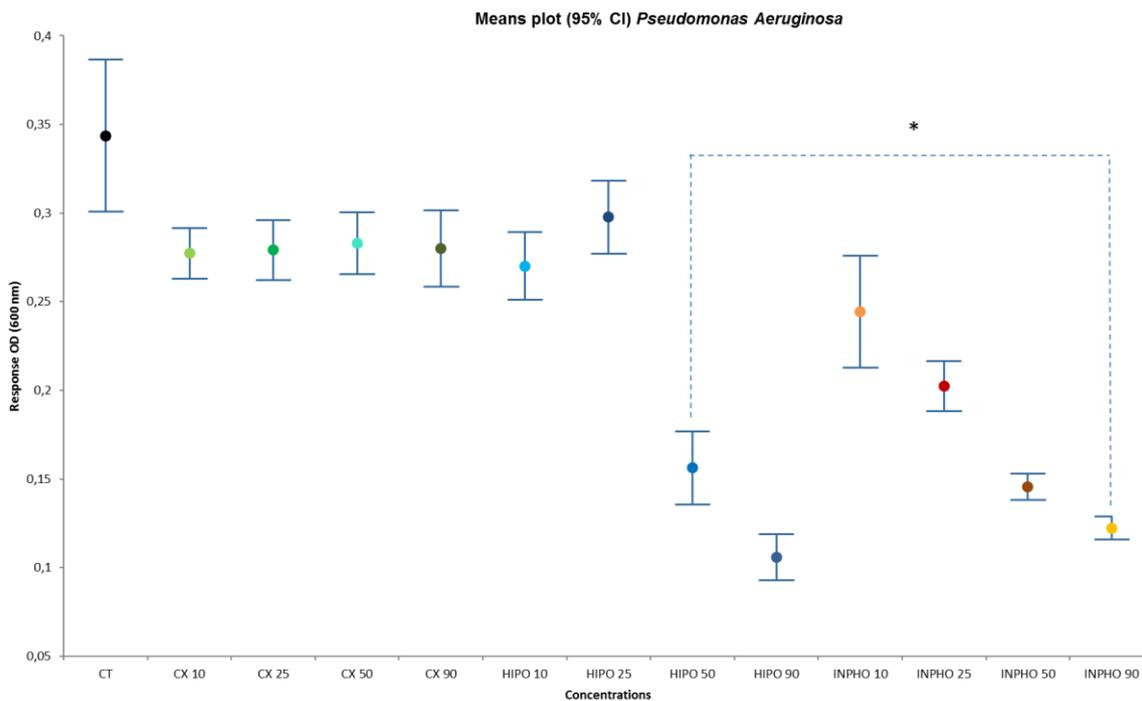


Figura 14. Curvas de crescimento da *pseudomonas aeruginosa* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 6 horas.



O símbolo “*” indica $p < 0.01$, comparações entre grupos e controle (One Way ANOVA, Bonferroni pós-teste)

Figura 15. Efeito antibacteriano da solução fitoterápica Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% em *Pseudomona aeruginosa*.

5.4. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

A solução fitoterápica teste na concentração de 90% teve um efeito bactericida contra o *Stafilococcus Aureus* que é muito parecido à ação do hipoclorito na mesma concentração na primeira hora de exposição, a clorexidina mostrou-se menos eficaz contra esta bactéria.

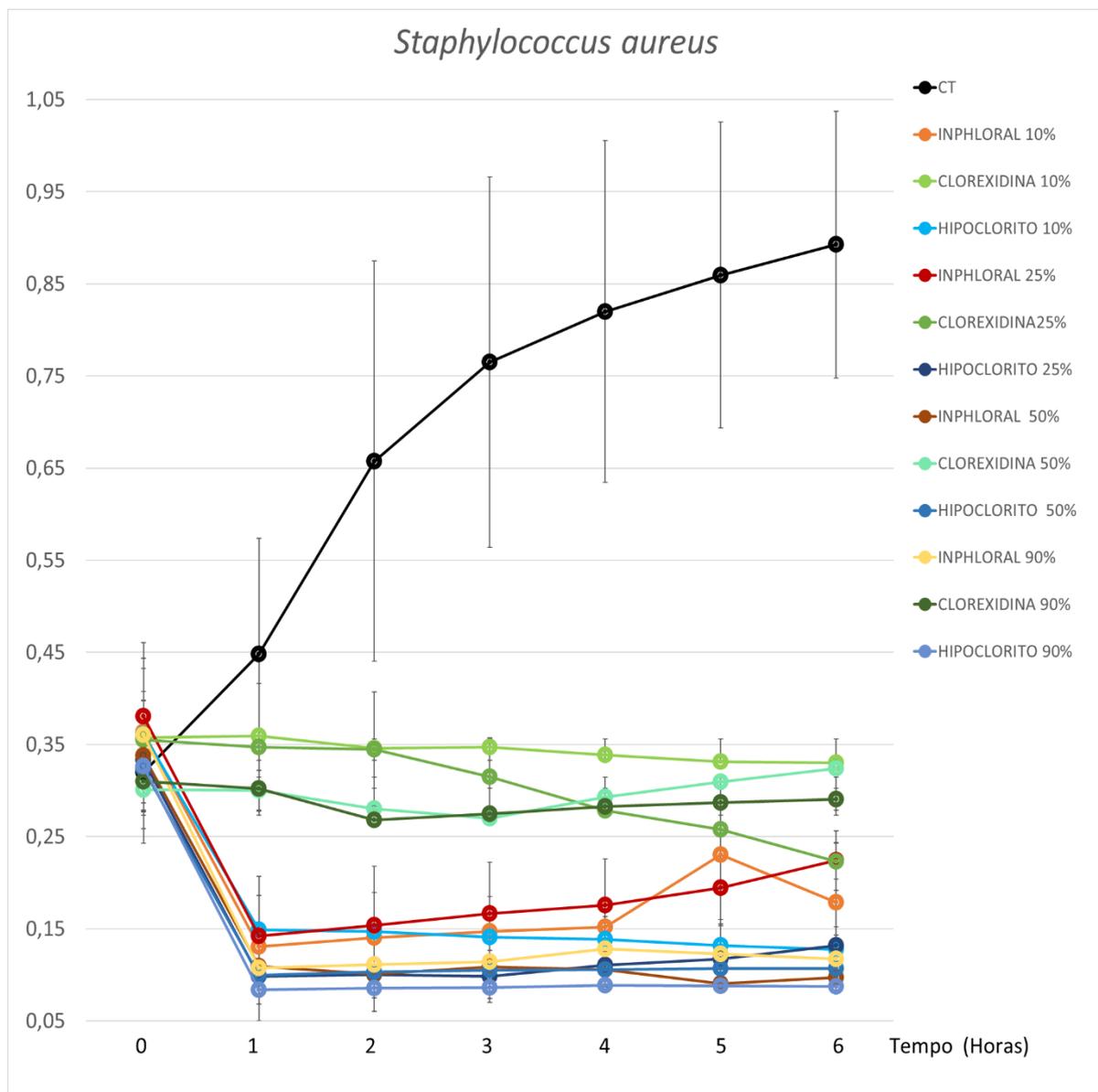
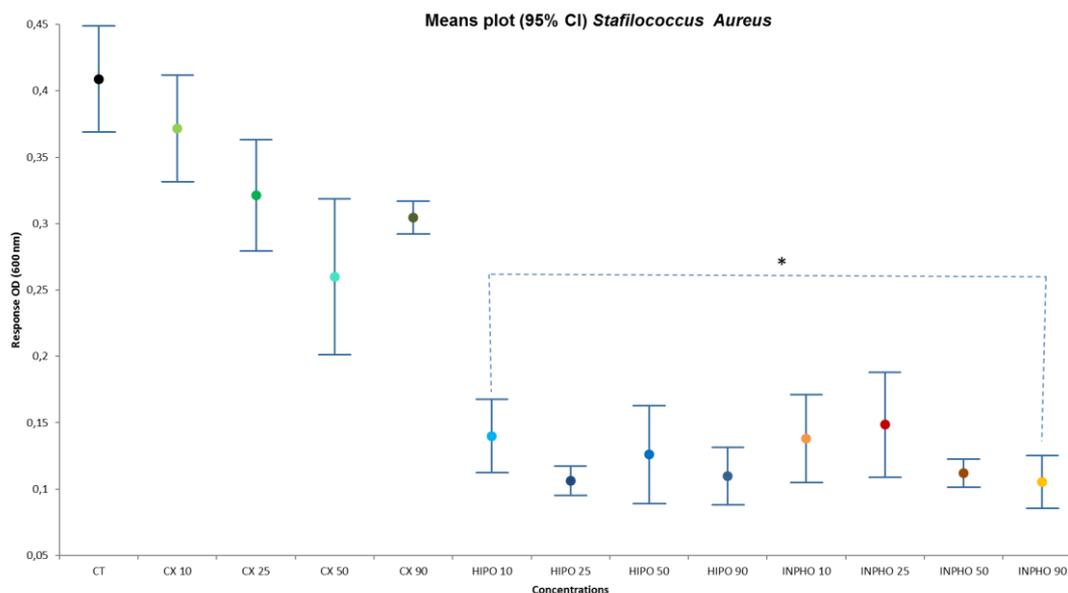


Figura 16. Curvas de crescimento do *Staphylococcus aureus* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 6 horas.

A solução de hipoclorito de sódio em concentrações de; 50% e 90% tiveram efeito bactericida contra o *Staphylococcus Aureus*, muito semelhante à solução fitoterápica Inphloral nas mesmas concentrações.



O símbolo “*” indica $p < 0,01$, comparações entre grupos e controle (One Way ANOVA, Bonferroni pós-teste)

Figura 17. Efeito bactericida do fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% contra *Staphylococcus Aureus*.

A solução de hipoclorito 90% teve maior efeito bactericida contra o *Staphylococcus Aureus*, sendo a mais eficaz contra esta bactéria.

5.5. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*

A solução fitoterápica nas concentrações de 50% e 90% teve um efeito bactericida similar ao do hipoclorito de sódio nas mesmas concentrações na primeira hora de exposição.

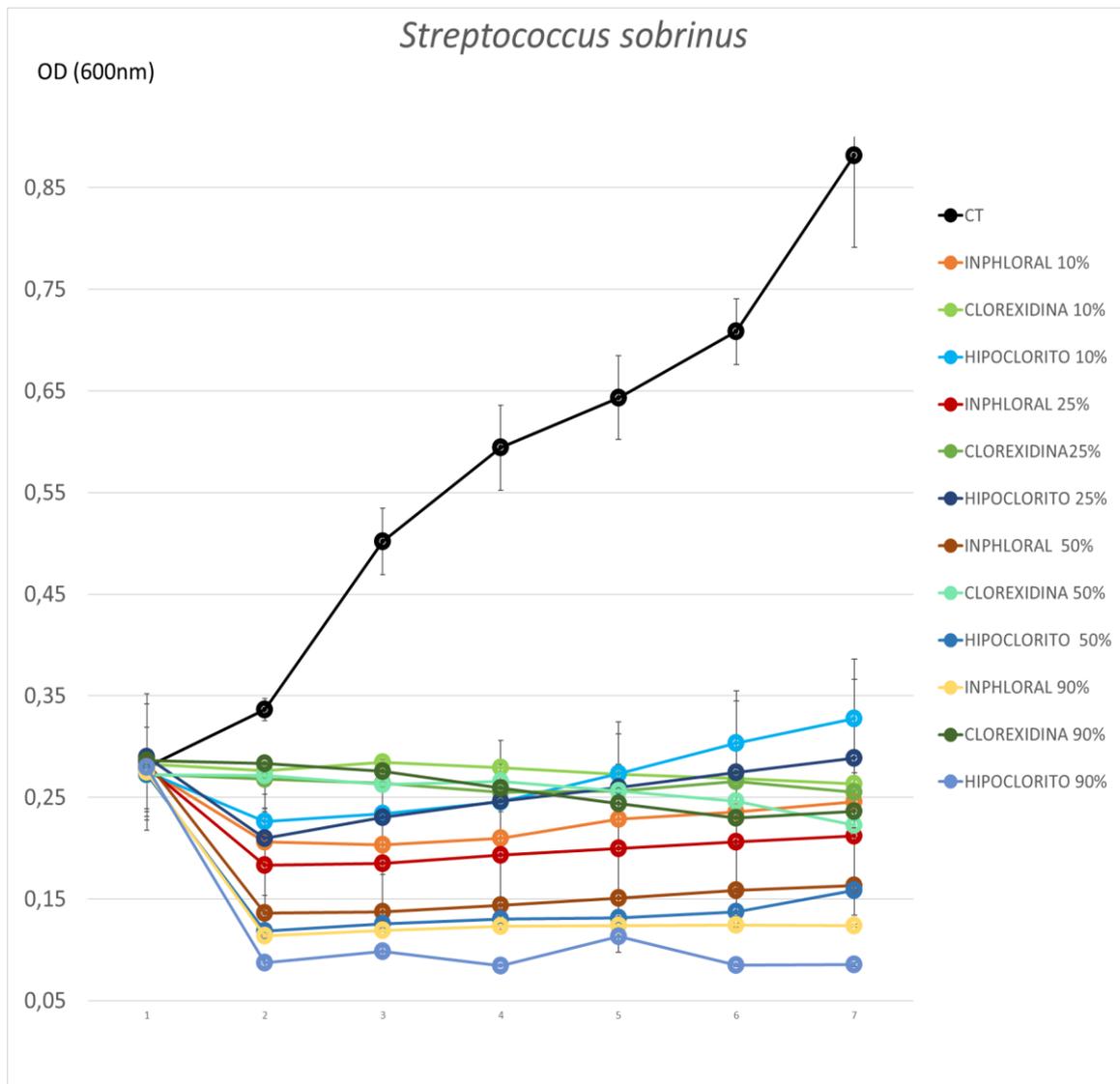
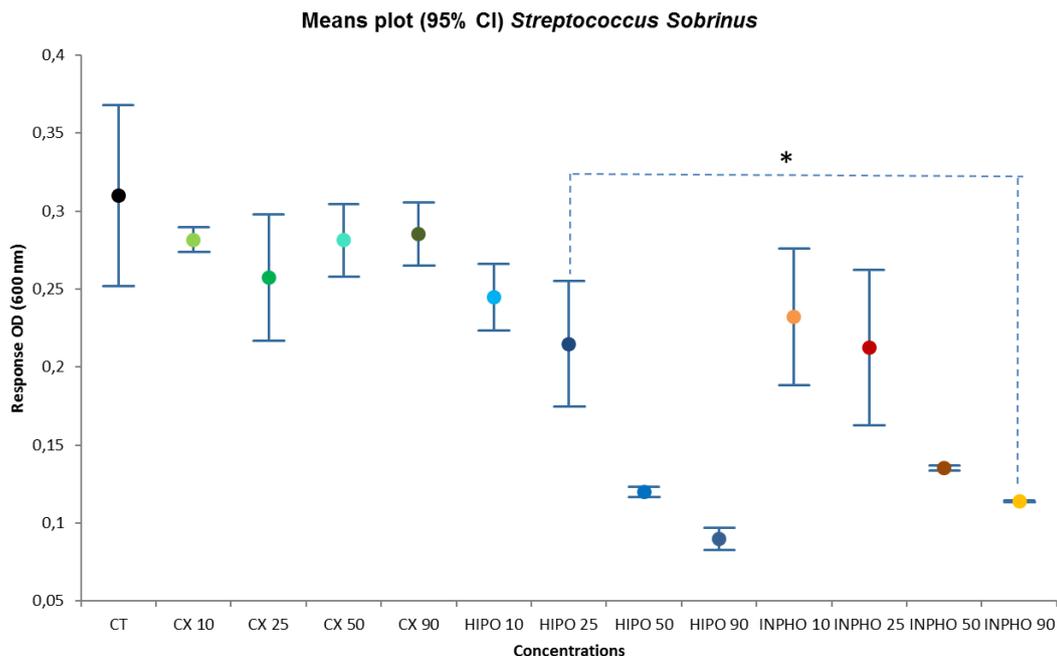


Figura 18. Curvas de crescimento do *Streptococcus sobrinus* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 6 horas.

Observamos na figura 18 que a solução de hipoclorito de sódio em suas concentrações de; 50 e 90% tem efeito bactericida contra *Streptococcus do Sobrinus*, muito semelhante à solução teste Inphloral em suas concentrações de; 50 e 90%.



O símbolo "*" indica $p < 0.01$, comparações entre grupos e controle (One Way ANOVA, Bonferroni pós-teste)

Figura 19. Efeito antibacteriano do fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% em *S. Sobrinus*.

5.6. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTUDADAS NAS CURVAS DE CRESCIMENTO EM *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Pode-se observar no gráfico que o irrigante Hipoclorito de Sódio em suas concentrações de; 50 e 90%, tem maior efeito bactericida contra *Streptococcus Mutans*, e a solução fitoterápica teste na concentração de 90% teve um efeito bactericida semelhante ao hipoclorito 2,5% na mesma concentração.

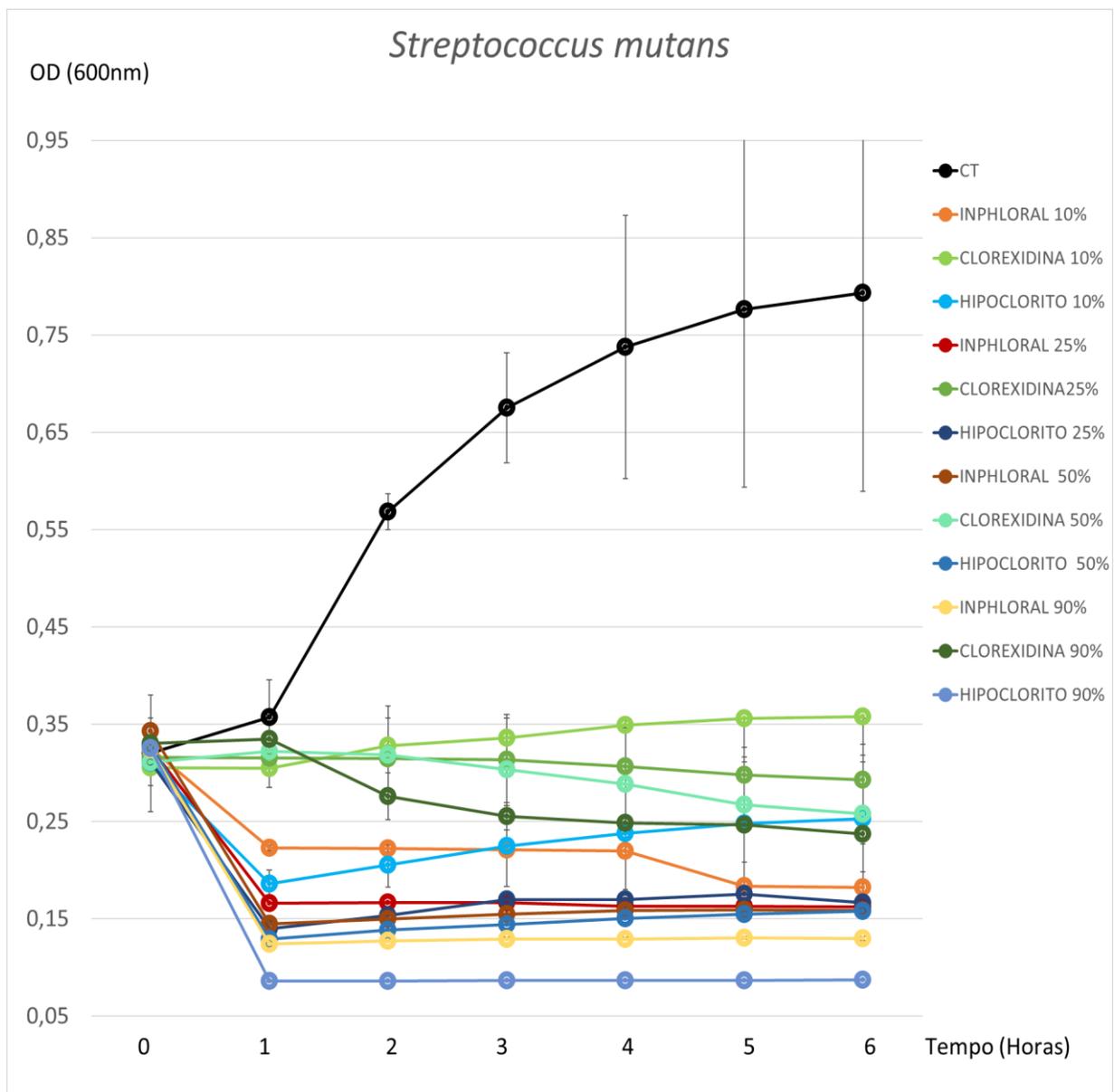
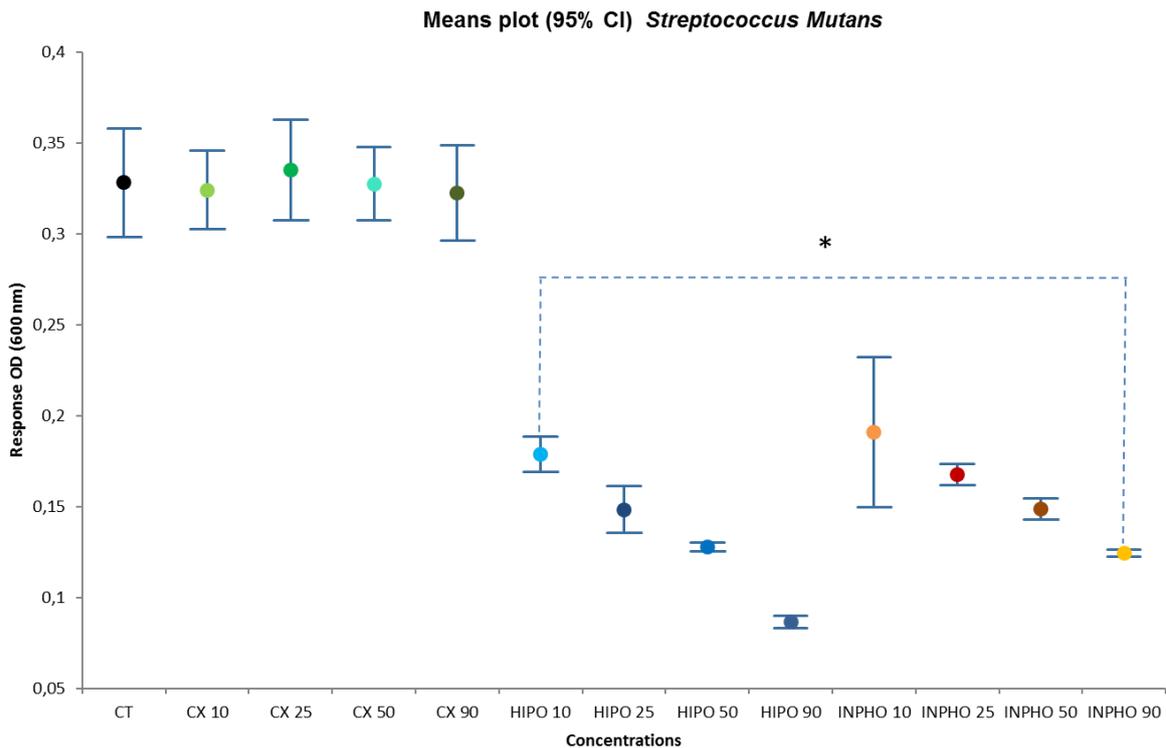


Figura 20. Curvas de crescimento do *Streptococcus mutans* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 6 horas.

Também pode ser observado que a curva de crescimento da clorexidina ao 90% só começou a descer após a primeira hora de exposição.



O símbolo "*" indica $p < 0,01$, comparações entre grupos e controle (One Way ANOVA, Bonferroni pós-teste)

Figura 21. Efeito antibacteriano da solução fitoterápica Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5%, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% contra *Streptococcus Mutans*.

O hipoclorito de Sódio 90% (C) teve maior efeito bactericida contra *Streptococcus Mutans*.

Os resultados mostraram efeito antibacteriano e antifúngico contra o crescimento de unidades formadoras de colônias das cepas de *Pseudomonas Aeruginosa*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Sobrinus*, *Streptococcus Mutans* e *Candida Albicans* semelhante para a solução fitoterápica teste Inphloral e NaOCl 2,5% nas concentrações de 50% e 90% às 1h e 6h de incubação.

Por fim, notamos em todos os gráficos que a solução aquosa de Clorexidina 2% em todas as suas concentrações foi estatisticamente menos eficaz do que os outros grupos principalmente na primeira hora de incubação.

5.7. GRUPO CONTROLE (CT)

Na tabela 4 é apresentado o crescimento das Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*,

Staphylococcus aureus, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e *Cândida Albicans*, que não foram expostas as soluções as soluções.

Tabela 4. Crescimento das unidades formadoras de colônias.

Microrganismo	UFC/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1147X10 ⁴
<i>Enterococcus faecalis</i>	6X10 ⁶
<i>Staphylococcus aureus</i>	216X10 ⁵
<i>Streptococcus sobrinus</i>	126X10 ³
<i>Streptococcus mutans</i>	1333X10 ⁴
<i>Cândida Albicans</i>	422X10 ³

6. DISCUSSÃO

O sucesso da terapia endodôntica depende da remoção substancial de tecidos vitais e necróticos, microrganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares [102]. Em alguns casos, a complexidade do sistema de canal radicular causa algumas dificuldades para modelar e limpar adequadamente o canal radicular. O desbridamento quimiomecânico combinando instrumentação mecânica com irrigantes químicos pode promover uma desinfecção adequada dos sistemas de canais radiculares durante o tratamento endodôntico. Isso provavelmente se deve à redução significativa de microrganismos intracanal e tecidos necróticos [103]. O conhecimento preciso da ocorrência dos principais patógenos endodônticos putativos e suas implicações na patogênese das doenças perirradiculares tem o potencial de fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias antimicrobianas eficazes no tratamento de infecções endodônticas primárias e persistentes ou secundárias [104]. A presença de bactérias remanescentes nos canais radiculares após a instrumentação é a principal causa de falha da terapia endodôntica [105].

E. faecalis é uma bactéria facultativa não-fastidiosa, fácil de crescer, com capacidade de formar biofilmes “monoespécies” e colonizar túbulos progressiva e rapidamente. *E. faecalis* tem cerca de nove vezes mais probabilidade de estar presente em dentes com infecções primárias do canal radicular [106]. Os canais radiculares de dentes com necrose pulpar, especialmente aqueles com infecções endodônticas persistentes, abrigam mais comumente as espécies de fungos *C. Albicans*, que tem capacidade de colonizar as paredes dentinárias e penetrar nos túbulos dentinários [107]. E assim que considerando a natureza destes organismos e sua capacidade de povoar e sobreviver em casos de terapia malsucedida, Cepas de *Enterococcus faecalis*, e o fungo *C. Albicans* assumem importância e foram uma escolha imprescindível para este estudo.

Cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e o fungo *C. Albicans* foram usadas no presente estudo para comparar a ação bactericida e antifúngica de dois irrigantes convencionais usados na endodontia comparados com uma solução fitoterápica, de associação de extrato de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* Inphloral. A escolha do meio de cultura no presente estudo foram os

caldos Sabouraud Dextrose e BHI, uma vez que esses meios estão disponíveis e são comumente usados para *C. albicans* e bactérias. Em nosso estudo, para determinar a eficácia antimicrobiana das soluções estudadas, foi usado o leitor de micro-placas espectrofotômetro de Biotek, pois é um método aceito e padronizado, tornando-o reprodutível e simples de realizar.

Vários irrigantes intracanal sintéticos têm sido usados há décadas para a eliminação de biofilmes bacterianos encontrados no sistema de canal radicular infectado. No entanto, o aumento constante da resistência antimicrobiana e efeitos das drogas sintéticas, fez com que os compostos fitoterapêuticos se tornassem populares devido à sua fácil disponibilidade, custo-benefício, baixa toxicidade e falta de resistência antimicrobiana [108]. As soluções selecionadas neste estudo para testar sua eficácia bactericida e antifúngica foram o hipoclorito (NaOCl 2.5%), clorexidina (CHX 2%) e *Tea Tree oil* e *Petitgrain* (Inphloral). Numerosos estudos avaliaram os efeitos antimicrobianos do NaOCl e da CHX no tratamento endodôntico, mais ainda nenhuma destas soluções cumprem todos os requisitos para se tornarem como irrigante ideal para o tratamento de canal radicular. NaOCl é o irrigante de escolha universalmente aceito. O NaOCl é um solvente orgânico altamente alcalino (pH 11-12,5) que pode induzir a dissolução do colágeno, clivando as ligações entre átomos de carbono e oxidando a composição primária da proteína [77]. As preparações de hipoclorito são esporocidas e virucidas e mostram efeitos de dissolução de tecido muito maiores em tecidos necróticos do que em tecidos vitais [6,7]. No entanto o uso de hipoclorito de sódio tem risco de extrusão nos tecidos periapicais, inflamação, equimoses, hematoma e, algumas vezes, necrose e parestesia [109]. A clorexidina é utilizada por ser considerada um agente antimicrobiano de amplo espectro e por ser bastante efetiva contra o *Enterococcus faecalis* além de ser biocompatível, entretanto, não dissolve tecidos orgânicos o que gera dúvidas em relação a sua capacidade de utilização como irrigante durante a terapia endodôntica. Outras razões são que ela não remove a *smear layer* e não é capaz de inativar os lipopolissacarídeos [86].

Os resultados obtidos mostraram que duas das três soluções testadas apresentaram capacidade semelhante bactericida e antifúngica promovendo a redução significativa dos microrganismos em comparação ao grupo controle onde houve crescimento típico para cada microrganismo. O extrato de *Tea Tree* (*Melaleuca*) e *Petitgrain* teve um efeito antibacteriano desejável sobre as bactérias

E. Faecalis, *E. Mutans*, *S. Aureus*, e *P. Aeuruginosa* e antifúngico sobre *C. albicans* e o efeito inibitório variou com a concentração e o tempo de contato. O presente estudo demonstra a eficácia antibacteriana e antifúngica da solução fitoterápica Inphloral quase equivalente a NaOCl 2.5% nas mesmas concentrações. NaOCl e Inphloral mostraram efeito antibacteriano semelhante às 1h e 6h de incubação, enquanto a CHX mostrou ser menos eficaz.

Assim os resultados justificam a realização de estudos *in vivo* da associação *Tea Tree oil* e *Petitgrain* (Inphloral) visando sua utilização como opção alternativa de uma solução auxiliar com potencial antimicrobiano para a desinfecção de canais na terapia endodôntica.

7. CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente as pesquisas estão mostrando maior interesse em produtos naturais. Pesquisas recentes sobre produtos fitoterápicos comprovaram que as ervas não são conhecidas apenas por seu sabor e fragrância, mas também por sua atividade antimicrobiana e valor medicinal.

Neste estudo *in vitro* os extratos de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium) (Inphloral)*, retirados da flora natural mostraram uma boa propriedade antibacteriana e antifúngica, sendo tão efetivo quando comparado com o hipoclorito de sódio 2,5%. Verificou-se que a solução *Tea Tree* e *Petitgrain* é eficaz na inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosas*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Candida albicans*, na forma planctônica.

O uso da solução fitoterapica de *Tea Tree* e *Petitgrain* como substância auxiliar do canal radicular pode ser uma alternativa, considerando as várias propriedades indesejáveis do NaOCl e da clorexidina, além de ter várias vantagens sobre o NaOCl, como fácil disponibilidade, maior vida útil, não apresenta efeitos colaterais, nenhuma resistência microbiana descrita, bom sabor e cheiro dentre outros. No entanto, como este estudo foi um estudo *in vitro*, estudos *in vivo* de longo prazo para verificar a eficácia podem ser úteis para avaliar ainda mais a ação antimicrobiana dos extratos de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* contra outros microrganismos encontrados nos canais radiculares. Seus efeitos nas propriedades físicas da dentina radicular devem ser avaliados. Sua profundidade de penetração nos túbulos dentinários também deve ser avaliada usando os métodos disponíveis.

A pesquisa pode progredir ainda mais, com um estudo clínico de longo prazo sobre se a solução de extrato de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)*, pode erradicar totalmente a carga microbiana e o *smear layer* do sistema de canal radicular, permitindo-nos desenvolver um regime de longo prazo para seu uso. No entanto, com o conhecimento detalhado que adquirimos com este estudo, podemos usar a solução de extrato de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* para reduzir o crescimento / carga microbiana. Por outro lado, o digluconato de clorexidina ao 2% parecia ser apenas bacteriostático quando diluído, e sua eficácia deve ser mais investigada.

8. REFERENCIAS

1. Luc W.M. van der Sluis, Bram Verhaagen, Ricardo Macedo, and Michel Versluis, *The Role of Irrigation 3 in Endodontics*, Springer International Publishing Switzerland 2016.
2. Ricucci D., Siqueira J.F., Jr. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J. Endod.* 2010; 36:1277–1288. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Alves, F.R.; Andrade-Junior, C.V.; Marceliano-Alves, M.F.; Perez, A.R.; Rocas, I.N.; Versiani, M.A.; Sousa-Neto, M.D.; Provenzano, J.C.; Siqueira, J.F., Jr. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J. Endod.* 2016, 42, 1667–1672. [CrossRef] [PubMed]
4. Vertucci, Frank J Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral surg.* Vol 58. Pag 589-99, Nov. 1984.
5. Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod.* 1997 Mar;23(3):167-9. doi: 10.1016/S0099-2399(97)80268-3. PMID: 9594757.
6. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 May;71(5):603-11. doi: 10.1016/0030-4220(91)90371-i. PMID: 2047103.
7. Tirali RE, Bodur H, Ece G. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octenidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 May 1;17(3):e517-22. doi: 10.4317/medoral.17566. PMID: 22143724; PMCID: PMC3476099.
8. Francisco KSF* Capa > v. 4, n. 1 (2010) > francisco, FITOTERAPIA: UMA OPÇÃO PARA O TRATAMENTO ODONTOLÓGICO FITOTHERAPY: AN OPTION IN ODONTOLOGICAL TREATMENT,

9. Cleghorn BM, Christie WH, Dong CC. Anomalous mandibular premolars: a mandibular first premolar with three roots and a mandibular second premolar with a C-shaped canal system. *Int Endod J.* 2008 Nov;41(11):1005-14. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01451.x. PMID: 19133090.
10. Hess W, Zurcher E: *The Anatomy of the root Canals of the teeth of the Stephen Cohen, et al, Cohen Caminhos da pulpa, 2011 Elsevier Editora Ltda.*
11. Kasahara E et al: Root canal system of the maxillary central incisor, *J Endod* (16): 158, 1998
12. Endodoncia técnica y fundamentos; Ilson José Soares; Fernando Goldberg
13. Ahmed HMA, Versiani MA, De-Deus G, Dummer PMH. A new system for classifying root and root canal morphology. *Int Endod J.* 2017 Aug;50(8):761-770. doi: 10.1111/iej.12685. Epub 2016 Oct 17. Erratum in: *Int Endod J.* 2018 Oct;51(10):1184. PMID: 27578418.
14. Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YC, Mazzi-Chaves JF, Carvalho KKT, Barbosa AFS, Versiani MA, Jacobs R, Leoni GB. Root canal preparation using micro-computed tomography analysis: a literature review. *Braz Oral Res.* 2018 Oct 18;32(suppl 1):e 66. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0066. PMID: 30365607.
15. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral*
16. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 20, 340 – 9
17. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod* 2013; 39: 712-718.
18. Vieira AR, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod* 2012; 38: 250-254.
19. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: A review. *Aust Endod J* 2009; 35: 131-139.
20. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan;34(1):1-10. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00396.x. PMID: 11307374.

21. Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, Siqueira JF, Jr: Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiol Immunol* 22:320, 2007.
22. Siqueira JF, Jr, Sen BH: Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:632, 2004.
23. Siqueira JF Jr, Rôças I. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endod Topics* 2014;30: 3-22.
24. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 2009;88: 969-981.
25. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34: 429-434.
26. Waltimo TMT, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14:128-137.
27. Nair PNR: Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 13:29, 1987.
28. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1–7.
29. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999 Sep;32(5):361-9. doi: 10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x. PMID: 10551109.
30. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:100 –3.
31. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):1-7. PMID: 9823122.
32. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30:315–20
33. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G (1990a) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics* 16, 580 – 8.

34. Waltimo TM, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J*. 1999 Mar;32(2):94-8. doi: 10.1046/j.1365-2591.1999.00195.x. PMID: 10371902.
35. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Jan;3(1):46-65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46. PMID: 2404568; PMCID: PMC358140.
36. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol* 2009; 155: 1749-57.
37. Padilla E, Carlos, Núñez A, María, Padilla G, Andrés, & Lobos G, Olga. (2012). Virulence genes and bacteriocins in *Enterococcus faecalis* strains isolated from different clinical samples in Maule Region, Chile. *Revista chilena de infectología*.
38. Ortega González, Lilia María. (2010). *Enterococos: actualización*. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 507-515. Recuperado en 08 de julio de 2021.
39. Franz C M, van Belkum M J, Holzapfel W H, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31: 293-10.
40. Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, et al. *aceW* which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by ERS and is involved in virulence. *Infect Immun* 2009; 77: 2832-9.
41. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod*. 2006; 32:104–9.
42. 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. doi: 10.4103/2231-0762.151956. PMID: 25767760; PMCID: PMC4355843.
43. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Jul;9(7):327-35. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02094-7. PMID: 11435107.
44. Mergoni, G.; Percudani, D.; Lodi, G.; Bertani, P.; Manfredi, M. Prevalence of *Candida* species in endodontic infections: Systematic review and meta-analysis. *J. Endod*. 2018, 44, 1616–1625.e1619. [CrossRef] [PubMed]
45. Gulati, M.; Nobile, C.J. *Candida albicans* biofilms: Development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016, 18, 310–321.

46. Douglas, L.J. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003, 11, 30–36.
47. Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. Candida albicans Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. *Microorganisms.* 2020 Aug 26;8(9):1300.
48. Fox EP, Cowley ES, Nobile CJ, Hartooni N, Newman DK, Johnson AD. 2014. Anaerobic bacteria grow within Candida albicans biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Curr Biol.* 24(20):2411–2416.
49. Ovchinnikova ES, Krom BP, Busscher HJ, van der Mei HC. 2012. Evaluation of adhesion forces of Staphylococcus aureus along the length of Candida albicans hyphae. *BMC Microbiol.* 12(1):281.
50. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. 1997. Growth patterns of Candida albicans in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 84(1):68–73.
51. Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, H€ansch GM, Filler SG, Jabra-Rizk MA, Shirliff ME. 2015. Systemic Staphylococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology.* 161(1):168–181.
52. Estrella Cervantes-García, Rafael García-González, Paz María Salazar Schettino. Características generales del Staphylococcus aureus.
53. Fredy Omar Gamboa Jaimes. Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of Streptococcus mutans: Research Experiences.
54. Sunde P, Olsen I, Debelian G, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002;28(4):304-10.
55. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. *Microbiological reviews.* 1980 Jun;44(2):331-84.
56. Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of Pseudomonas aeruginosa. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019 Nov 7;35(11):178. doi: 10.1007/s11274-019-2739-1. PMID: 31701321; PMCID: PMC6838043.
57. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1–11.

58. Rôças IN, Siqueira JF. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One* 2018;13:e0190469.
59. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* 2009;9(6): 1132-47. doi: 10.1016/j.meegid.2009.08.001.
60. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context* 7:1–18.
61. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19:419–426.
62. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55 (12): 5676-84. doi: 10.1128/AAC.00101-11.
63. Chandra, J.; Kuhn, D.M.; Mukherjee, P.K.; Hoyer, L.L.; McCormick, T.; Ghannoum, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 5385–5394.
64. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32:389- 98.
65. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002 13: 113-117.
66. Hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro,” *International Endodontic Journal*, vol. 30, no. 4, pp. 279–282, 1997.
67. M. V. R. Sa, F. V. Vier-Pelisser, M. S. Darcie, D. G. R. Smaniotto, ´ F. Montagner, and M. C. Kuga, “Pulp tissue dissolution when the use of sodium hypochlorite and EDTA alone or associated,” *Revista Odonto Ciencia*, vol. 26, no. 2, pp. 156–160, 2011.
68. Z. Mohammadi, “Sodium hypochlorite in endodontics: An update review,” *International Dental Journal*, vol. 58, no. 6, pp. 329–341, 2008.
69. M. Andersen, A. Lund, J. O. Andreasen, and F. M. Andreasen, “In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite,” *Dental Traumatology*, vol. 8, no. 3, pp. 104–108, 1992.

70. J. Craig Baumgartner and C. L. Mader, "A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation reg.
71. Currey JD, Brear K, Zioupos P. Dependence of mechanical properties on fibre angle in narwhal tusk, a highly oriented biological composite. *J Biomech* 1994 27: 885–897. 77.
72. Stoward PJ. A histochemical study of the apparent deamination of proteins by sodium hypochlorite. *Histochem* 1975 45: 213–226. 78. Marending M, Luder UH, Brunner TJ et al. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine – mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J* 2007 40: 786-793.
73. ZEHNDER, M. Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, New York, v. 32, no. 5, p. 389-398, May. 2006.
74. Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998 24: 414-416.
75. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000 26: 331-334.
76. Maud Guivarc'h, Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review (*J Endod* 2017;43:16–24).
77. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985; 11:525–8.
78. O'Hoy PY, Messer HH, Palamara JE. The effect of cleaning procedures on fracture properties and corrosion of NiTi files. *Int Endod J* 2003 26: 724–732.
79. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008 Dec;58(6):329-41. doi: 10.1111/j.1875-595x.2008.tb 00354.x. PMID: 19145794.
80. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod* 1989 5: 224-226.
81. Perotti S, Bin P, Cecchi R. Hypochlorite accident during endodontic therapy with nerve damage - A case report. *Acta Biomed*. 2018 Mar 27;89(1):104-108. doi: 10.23750/abm. v89i1.6067. PMID: 29633752; PMCID: PMC6357615.
82. Bernardi A, Teixeira CS. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. *Quintessence Int*. 2015 Jul-Aug;46(7):575-82. doi: 10.3290/j.qi. a33934. PMID: 25918757.

83. Russell AD. Activity of biocides against mycobacteria. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1996; 25:87S–101S.
84. Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. J Hosp Infect 1993;25: 229–38.
85. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod. 1994; 20:276-8.
86. Bernardi A, Teixeira CS. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. Quintessence Int. 2015 Jul-Aug;46(7):575-82. doi: 10.3290/j.qi. a33934. PMID: 25918757.
87. Francisco Carlos Groppo, Cristiane de Cássia Bergamaschi, Karina Cogo, Michelle Franz-Montan, Rogério Heládio Lopes Motta and Eduardo Dias de Andrade, PHYTOTHERAPY RESEARCH, Phytother. Res. 22, 993–998 (2008), Published online 20 June 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/ptr.2471
88. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). 2000. Braz J Med Biol Res 33: 179–189.
89. Kumar G, Jalaluddin M, Rout P, Mohanty R, Dileep CL. 2013. Emerging trends of herbal care in dentistry. J Clin Diagn Res. 7:1827–1829.
90. Sinha DJ, Sinha AA. 2014. Natural medicaments in dentistry. Ayu. 35:113–118.
91. Pujar M, Makandar SD. 2011. Herbal usage in endodontics- a review. Int J Contem Dent. 2:34–37.
92. Camila de Melo Aleluia, Viviane de Cássia Procópio, Marília Terezinha Gonçalves Oliveira. FITOTERÁPICOS NA ODONTOLOGIA.
93. 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. doi: 10.1080/19390211.2016.1207004. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27715358.
94. <http://www.inphloral.com.br>
95. Parle M, Bansal N. Herbal medicines: Are they safe. Nat Prod Radiance. 2006; 5:6–14.

96. Kamath U, Sheth H, Ramesh S, Singla K. Comparison of the antibacterial efficacy of tea tree oil with 3% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine against *E. faecalis*: An in vitro study. *J Contem Dent*. 2013;3(3):117–120.
97. Dosoky NS, Setzer WN. Biological Activities and Safety of Citrus spp. Essential Oils. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 5;19(7):1966. doi: 10.3390/ijms19071966. PMID: 29976894; PMCID: PMC6073409.
98. Ao Y., Satoh K., Shibano K., Kawahito Y., Shioda S. Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from Rutaceae. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2008; 43:6–12. doi: 10.3164/jcbn.2008037.
99. Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Theriou K., Therios I. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*. 2013;18: 10639–10647. doi: 10.3390/molecules180910639.
100. Ellouze I., Abderrabba M., Sabaou N., Mathieu F., Lebrihi A., Bouajila J. Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: Chemical composition and biological activities. *J. Food Sci*. 2012; 77:1–2. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02846. x.
101. Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M.L.; Mello, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor
102. Gu L, Kim JR, Ling J, et al. Review of contemporary irrigant agitation techniques and
103. Kuruvilla JR, Kamath P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998; 24:472–6.
104. JOSÉ F. SIQUEIRA JR e ISABELA N. RÔÇAS. Microbiologia e Tratamento de Infecções Endodônticas
105. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005 Jul;31(7):488-98. doi: 10.1097/01.don.0000157990.86638.49. PMID: 15980706
106. Haapasalo M., Udnæs T., Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod. Top*. 2003; 6:29–56. doi: 10.1111/j.1601-1546.2003.00041. x.

107. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Ghodse Hosseini MR. Presence of *Candida Albicans* in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions. *Iran Endod J.* 2007 Spring;2(1):24-8. Epub 2007 Apr 1. PMID: 24348654; PMCID: PMC3863409.
108. 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. PMID: 24651335.
109. Tirali RE, Bodur H, Ece G. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octenidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 May 1;17(3): e517-22. doi: 10.4317/medoral.17566. PMID: 22143724; PMCID: PMC3476099.
110. Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. *Candida albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. *Microorganisms.* 2020 Aug 26;8(9):1300.

APÊNDICE 1

O artigo apresentado a continuação, foi escrito nas normas da Revista Argentina de Microbiologia, para futura submissão.

Potencial antimicrobiano da associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* contra microrganismos presentes no sistema de canais: Estudo *in vitro*

Karla Viviana Valencia Ballesteros¹, Juliana Rodrigues E¹. Silva, Rafael Brasil², Loise Pedrosa Salles¹

¹Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

² Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

RESUMO:

O objetivo de este estudo foi avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano da associação de óleos *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* (INPHLORAL) contra microrganismos presentes no sistema de canais na forma planctônica comparada ao hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2%. Inóculos de cepas de bactérias: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e o fungo *Candida albicans* foram misturadas com a solução teste de *Tea Tree* e *Petitgrain* (Inphloral) e as soluções clorexidina 2% (CHX) e hipoclorito 2,5% (NaOCl) em diferentes diluições de 10%, 25%, 50% e 90% e pipetadas em placas Petri, o crescimento bacteriano foi avaliado usando o espectrofotômetro de microplacas Epoch 2 BioTek (600nm) a 37 °C, com medições realizadas a cada 30 minutos por 2 horas. Os resultados mostraram efeito antibacteriano semelhante para associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* e hipoclorito 2,5% nos períodos de 1h e 2h de incubação. O grupo solução aquosa de Clorexidina 2% foi estatisticamente menos eficaz principalmente na primeira hora de incubação. Os extratos da associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* retirados da flora natural mostraram uma boa propriedade antibacteriana e antifúngica sendo tão efetivo quando comparado com o hipoclorito de sódio 2,5% nas mesmas concentrações.

Palavras-chave: Endodontia; irrigantes endodônticos; Hipoclorito de Sódio; Clorhexidina; Fitoterapia; *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)*; *Petitgrain (citrus aurantium)*.

ABSTRACT:

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial potential of the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* (INPHLORAL) oils against microorganisms present in the channel system in planktonic form compared to 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine. Inoculums of bacterial strains: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* and the fungus *Candida albicans* were mixed with the test solution of *Tea Tree* and *Petitgrain* (Inphloral) and the chlorhexidine solutions and 2% (CHX) 2.5% (NaOCl) at different dilutions of 10%, 25%, 50% and 90% and pipetted into Petri dishes, bacterial growth was evaluated using the Epoch 2 BioTek microplate spectrophotometer (600nm) at 37 °C, with measurements taken every 30 minutes for 2 hours. The results showed a similar antibacterial effect for the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* essential oils and 2.5% hypochlorite in the 1h and 2h incubation periods. The 2% Chlorhexidine aqueous solution group was statistically less effective mainly in the first hour of incubation. The extracts of the association of *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* and *Petitgrain (citrus aurantium)* essential oils taken from the natural flora showed a good antibacterial and antifungal property, being so effective when compared with 2.5% sodium hypochlorite at the same concentrations.

Keywords: Endodontics; endodontic irrigants; Sodium hypochlorite; Chlorhexidine; Phytotherapy; *Tea tree (Melaleuca alternifolia)*; *Petitgrain (citrus aurantium)*

1. Introdução

O objetivo de um tratamento de canal radicular é prevenir ou curar a periodontites apical (AP). Por tanto, microrganismos que invadiram o sistema de canais radiculares devem ser removidos para facilitar a cicatrização.⁽¹⁾

Os resultados do preparo do sistema de canais radiculares são fortemente afetados por sua grande variabilidade anatômica.⁽²⁾ Os agentes microbianos tendem a penetrar na estrutura dentária e se acumular nos canalículos dentinários, a uma profundidade considerável, onde provavelmente produzem biofilmes endodônticos e dificilmente são alcançados por instrumentos endodônticos e irrigantes⁽³⁾, especialmente em casos de anatomia complexa, canais laterais e ramificações apicais⁽⁴⁻⁵⁾.

Diante dessa variação soluções de irrigação são necessárias para erradicar a microbiota e, ao longo do tempo, uma variedade de soluções químicas tem sido promovidas para este propósito. Um irrigante ideal ou uma combinação deles devem matar bactérias, dissolver tecido necrótico, lubrificar o canal, remover a *smear layer* e não irritar tecidos saudáveis.⁽⁶⁾

O uso de NaOCl para preparo biomecânico de canais radiculares é um procedimento clinicamente aceitável e altamente eficaz. Deve-se ressaltar, no entanto, que o NaOCl é um agente muito cáustico, inespecífico, cuja ação não se limita ao tecido necrótico. É citotóxico para todas as células, exceto epitélio altamente queratinizado⁽⁷⁾. O Hipoclorito de sódio (NaOCl), possui propriedades importantes como, atividade antimicrobiana, dissolução tecidual entre outras.⁽⁸⁻⁹⁾ Até agora, nenhuma outra solução foi compatível com a eficácia do NaOCl. No entanto, a atividade citotóxica é uma deficiência bem conhecida do NaOCl, que pode causar efeitos agudos de lesão se atingir a área periapical.⁽¹⁰⁾

É citotóxico para todas as células, exceto epitélio altamente queratinizado.⁽¹¹⁾

A clorexidina é amplamente utilizada na desinfecção em odontologia devido à sua boa atividade antimicrobiana⁽¹²⁻¹³⁾. É utilizada por ser considerada agente antimicrobiano de amplo espectro e por ser bastante efetiva contra o *Enterococcus faecalis* além de ser biocompatível. Entretanto, não dissolve tecidos orgânicos o que gera dúvidas em relação a sua capacidade de utilização como irrigante durante a terapia endodôntica. Outras razões são que ela não remove a *smear layer* e não é capaz de inativar os lipopolissacarídeos.⁽¹⁴⁾

O uso de CHX como irrigante endodôntico é restrito, pois pode descolorir os dentes e também não possui capacidade de dissolução de tecidos. Outros efeitos colaterais incluem perda de paladar, sensação de queimação da mucosa oral, secura subjetiva da cavidade oral e descoloração da língua.⁽¹⁵⁾

Os produtos fitoterápicos são usados desde os tempos antigos na medicina popular, envolvendo as

tradições médicas orientais e ocidentais⁽¹⁵⁾. Nas últimas décadas, as empresas farmacêuticas têm se interessado em investigar as plantas como fontes de novos fitoterápicos com eficácia, segurança e qualidade comprovadas⁽¹⁶⁾. Os fitoterápicos são obtidos através de plantas e podem ser utilizados como remédios artesanais sob forma de chás, soluções, comprimidos, dentre outros⁽¹⁷⁾.

O campo da odontologia também começou a explorar as propriedades das ervas com o propósito de aliviar a dor de dente, a inflamação das gengivas e as aftas.⁽¹⁸⁾ Os agentes anti-sépticos, antibacterianos, antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, antivirais e analgésicos derivados de plantas são de amplo interesse em odontologia.⁽¹⁹⁾ Por exemplo, nos últimos anos, no campo da periodontia e endodontia, diversos extratos vegetais como própolis, fruta noni, raiz de bardana e folha de nim têm sido usados como medicamentos intracanal com excelentes resultados, abrindo uma nova função para os agentes fitoterápicos na terapia odontológica global.⁽²⁰⁾

Assim em meio às desvantagens do hipoclorito de sódio e da clorexidina o presente estudo visa abordar sobre fitoterápicos como solução auxiliar na terapia endodôntica.⁽¹³⁾

O uso de fitoterápicos na Odontologia apresenta como vantagem custo acessível, fácil manuseio, grande quantidade de matéria prima, menos efeitos colaterais se comparados a medicamentos não fitoterápicos. Além disto, possuem atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, ansiolítica, cicatrizante dentre outras.⁽²¹⁾

Um exemplo de fitoterápico que esta gerando pesquisas como solução auxiliar na endodontia é a associação de óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* (Inphloral). Por ser um produto 100% natural, sem adição de álcool, flúor ou qualquer substancia química, pois, o que o gera não é tóxico. É antibacteriano, antifúngico, antiviral e analgésico. Sua fórmula contém óleos essenciais o que proporciona sabor e odor agradável.⁽²²⁾

A fitoterapia pode trazer muitos benefícios na odontologia, principalmente em relação a soluções irrigadoras. Além de grandes benefícios ao ser humano, possui baixo custo e gera grande efetividade.

O objetivo de este estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosas*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus sobrinus* e antifungica sobre *Candida albicans*, na forma planctônica de uma solução fitoterápica baseada no *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)*(Inphloral) comparado ao hipoclorito 2,5% de sódio e clorexidina 2%.

2. Material e métodos

O potencial antimicrobiano da solução de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* foi comparada com as soluções hipoclorito 2,5% e clorexidina 2% em 5 bactérias e um fungo. A

quantidade de microrganismos foi obtida por meio de análise nefelométrica com uso de espectrofotômetro de massa.

Inóculo dos microrganismos

Cepas de bactérias: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27843), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) foram inoculadas em tubos Falcon de 50mL contendo meio Brain Heart Infusion, BHI, para as bactérias e meio Sabouraud Dextrose para o fungo. As amostras foram incubadas a 37°C durante 18 horas em Shaker (Equipamento de agitação orbital constante).

Diluições dos microrganismos

Após as 18 horas os inóculos foram retirados do Shaker e foram levados para, o fluxo laminar onde em placas de cultura de células de 96 poços estéril (TPP ref. 9296, Europe/Switzerland) foram pipetados 200 µL dos inóculos das bactérias e do fungo, misturadas com a solução teste *Tea Tree e Petitgrain* (Inphloral) e as soluções clorexidina 2% (CHX) e hipoclorito 2,5% (NaOCl) nas diluições de 10%, 25%, 50% e 90%. Todas as bactérias e o fungo não expostos as soluções foram o grupo controle (CT). O crescimento bacteriano foi avaliado usando o espectrofotômetro de microplacas Epoch 2 BioTek (600nm) a 37 °C, com medições realizadas a cada 30 minutos por 2 horas estabelecendo a curva de crescimento. As experiências foram repetidas 2 vezes de forma independente.

Mensuração da CFU

As bactérias e o fungo não expostos as soluções foram diluídas 10^{-2} e 10^{-3} e foi pipetado 100 µL e plaqueadas em placas Petri ágar para a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU), as placas foram levadas para estufa a 37 °C durante 24 horas.

As Unidades Formadoras de Colônias (CFU) foram contadas das placas Petri ágar de todas as bactérias e do fungo. Cada placa foi somada, a média aritmética foi calculada e multiplicada pela diluição correspondente.

3. Estatística

Os dados estatísticos foram tabulados em planilhas Excel e submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e análise de varância One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (STATA IC 15.1, StataCorp, College Station, Texas, USA). N= 9/grupo, valor p <0,05 foi considerado significativo.

4. Resultados

Todas as soluções irrigantes reduziram significativamente as contagens dos microrganismos em comparação com o grupo controle que foram os poços não tratados com as soluções e mostraram um aumento uniforme de crescimento.

Os resultados mostraram efeito antibacteriano semelhante para solução de *Tea Tree (Melaleuca*

alternifolia) e Petitgrain (citrus aurantium) e NaOCl às 1h e 2h de exposição. O grupo CHX foi estatisticamente menos eficaz do que os outros grupos na primeira hora de incubação.

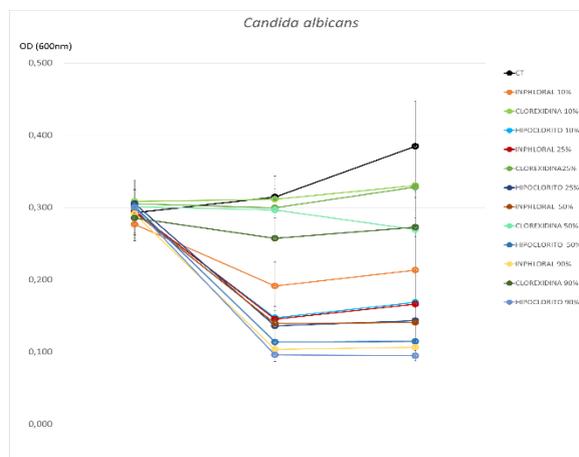


Figura 1. Curvas de crescimento da *C. Albicans* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 2 horas.

Pode se observar que o irrigante fitoterápico teste nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% teve um efeito fungicida contra a *Candida Albicans* em todas as concentrações, demonstrando sua eficácia no controle do crescimento do fungo, a concentração na diluição de 90 % foi a mais efetiva tendo um efeito bactericida similar ao hipoclorito de sódio.

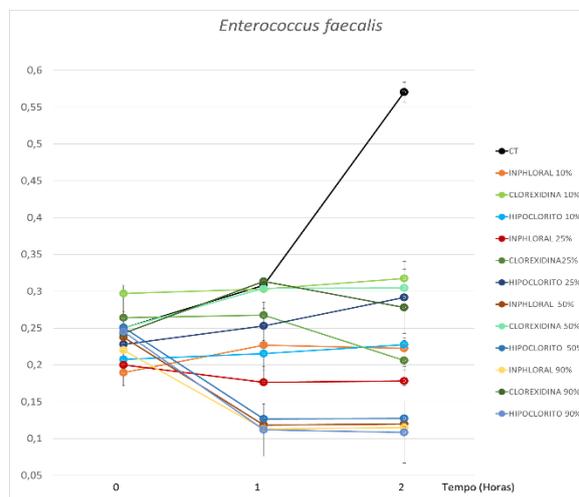


Figura 2. Curvas de crescimento do *Enterococcus faecalis* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 2 horas.

Pode se observar na figura 2 que a solução fitoterápica teste nas concentrações de; 50% e 90% teve um efeito bactericida contra o *Enterococcus faecalis*, demonstrando sua eficácia no controle do crescimento bacteriano superior à clorexidina nas mesmas concentrações e com ação bactericida muito parecido ao do hipoclorito de sódio nas mesmas concentrações.

A concentração na diluição de 90% de hipoclorito foi a mais eficaz contra o *E. Faecalis*.

A clorexidina ainda na concentração maior de 90% não teve uma ação bactericida desejável contra o *E. Faecalis*, principalmente na primeira hora de incubação.

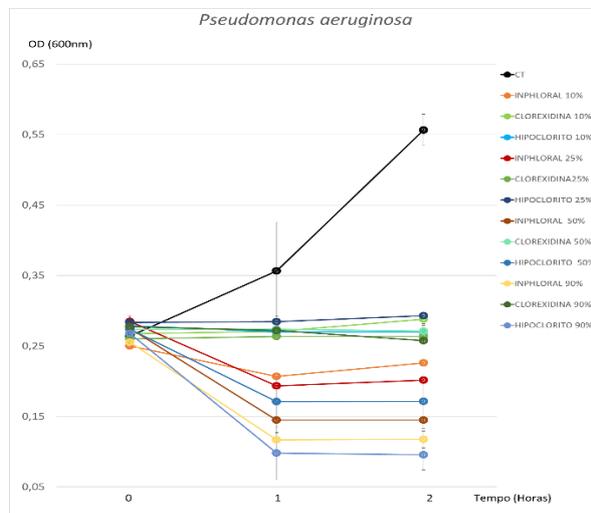


Figura 3. Curvas de crescimento do *Pseudomona aeruginosa* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 2 horas.

Observamos que a solução fitoterápica teste teve um efeito bactericida contra a *Pseudomona aeruginosa* na concentração de 90% muito semelhante à ação do hipoclorito de sódio na mesma concentração de 90% na primeira hora de incubação.

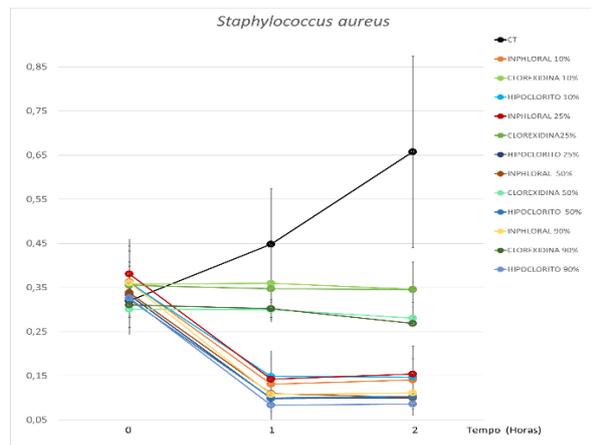


Figura 4. Curvas de crescimento do *Staphylococcus aureus* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 2 horas.

O irrigante fitoterápico teste teve um efeito bactericida contra o *Stafilococcus Aureus* que é muito parecido à ação do hipoclorito, a clorexidina mostrou-se menos eficaz contra esta bactéria.

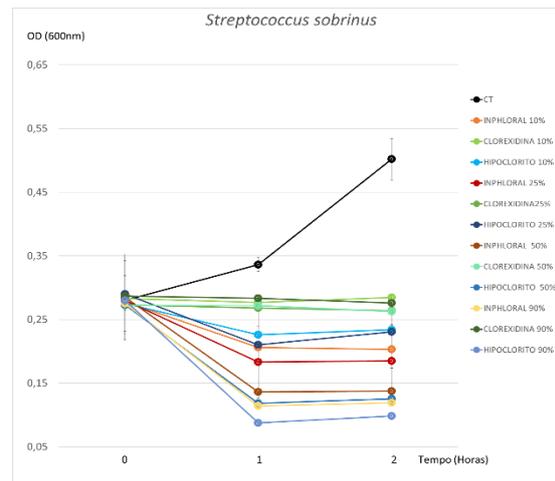


Figura 5. Curvas de crescimento do *Streptococcus sobrinus* exposta às 3 soluções: fitoterápico Inphloral, clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %, nas concentrações de 10%; 25; 50% e 90% com medições a cada 30 minutos durante 2 horas.

A solução fitoterápica nas concentrações de 50% e 90% teve um efeito bactericida similar ao do hipoclorito de sódio nas mesmas concentrações na primeira hora de exposição.

4. Discussão

O sucesso da terapia endodôntica depende da remoção substancial de tecidos vitais e necróticos, microrganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares.⁽²³⁾ Em alguns casos, a complexidade do sistema de canal radicular causa algumas dificuldades para modelar e limpar adequadamente o canal radicular.

O desbridamento quimiomecânico combinando instrumentação mecânica com irrigantes químicos pode promover uma desinfecção adequada dos sistemas de canais radiculares durante o tratamento endodôntico. Isso provavelmente se deve à redução significativa de microrganismos intracanal e tecidos necróticos.⁽²⁴⁾

O conhecimento preciso da ocorrência dos principais patógenos endodônticos putativos e suas implicações na patogênese das doenças perirradiculares tem o potencial de fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias antimicrobianas eficazes no tratamento de infecções endodônticas primárias e persistentes ou secundárias.⁽²⁵⁾

A presença de bactérias remanescentes nos canais radiculares após a instrumentação é a principal causa de falha da terapia endodôntica.⁽²⁶⁾

E. faecalis é uma bactéria facultativa não-fastidiosa, fácil de crescer, com capacidade de formar biofilmes monoespécies e colonizar túbulos progressiva e rapidamente. *E. faecalis* tem cerca de nove vezes mais probabilidade de estar presente em dentes com infecções primárias do canal radicular.⁽²⁷⁾ Os canais radiculares de dentes com necrose pulpar, especialmente aqueles com infecções endodônticas persistentes, abrigam mais comumente as espécies de fungos *C. Albicans*, que tem capacidade de colonizar as

paredes dentinárias e penetrar nos túbulos dentinários.⁽²⁸⁾

Cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e o fungo *C. Albicans* foram usadas no presente estudo para comparar a ação bactericida e antifúngica de dois irrigantes convencionais usados na endodontia comparados com uma solução fitoterápica, de associação de extrato de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* Inphloral.

A escolha do meio de cultura no presente estudo foram os caldos Sabouraud Dextrose e BHI, uma vez que esses meios estão disponíveis e são comumente usados para *C. albicans* e bactérias.

Em nosso estudo, para determinar a eficácia antimicrobiana das soluções estudadas, foi usado o leitor de micro placas espectrofotômetro de Biotek, pois é um método aceito e padronizado, tornando-o reproduzível e simples de realizar.

Vários irrigantes intracanal sintéticos têm sido usados há décadas para a eliminação de biofilmes bacterianos encontrados no sistema de canal radicular infectado. No entanto, o aumento constante da resistência antimicrobiana e efeitos das drogas sintéticas, fez com que os compostos fitoterapêuticos se tornassem populares devido à sua fácil disponibilidade, custo-benefício, baixa toxicidade e falta de resistência antimicrobiana.⁽²⁹⁾

As soluções selecionadas neste estudo para testar sua eficácia bactericida e antifúngica foram o hipoclorito (NaOCl 2.5%), clorexidina (CHX 2%) e *Tea Tree oil e Petitgrain* (Inphloral).

Numerosos estudos avaliaram os efeitos antimicrobianos do NaOCl e da CHX no tratamento endodôntico, mais ainda nenhuma destas soluções cumprem todos os requisitos para se tornarem como irrigante ideal para o tratamento de canal radicular.

NaOCl é o irrigante de escolha universalmente aceito. O NaOCl é um solvente orgânico altamente alcalino (pH 11-12,5) que pode induzir a dissolução do colágeno, clivando as ligações entre átomos de carbono e oxidando a composição primária da proteína.⁽³⁰⁾

No entanto o uso de hipoclorito de sódio tem risco de extrusão nos tecidos periapicais, inflamação, equimoses, hematoma e, algumas vezes, necrose e parestesia.⁽³¹⁾

A clorexidina é utilizada por ser considerada um agente antimicrobiano de amplo espectro e por ser bastante efetiva contra o *Enterococcus faecalis* além de ser biocompatível. Entretanto, não dissolve tecidos orgânicos o que gera dúvidas em relação a sua capacidade de utilização como irrigante durante a terapia endodôntica. Outras razões são que ela não remove a *smear layer* e não é capaz de inativar os lipopolissacarídeos.⁽³²⁾

Os resultados obtidos mostraram que duas das três soluções testadas apresentaram capacidade semelhante bactericida e antifúngica promovendo a redução significativa dos microrganismos em comparação ao grupo controle onde houve crescimento típico para cada microrganismo.

O extrato de *Tea Tree (Melaleuca)* e *Petitgrain* teve um efeito antibacteriano desejável sobre as bactérias *E. Faescalis*, *E. Mutans*, *S.Aureus*, e *P. Aeuruginosa* e antifúngico sobre *C. albicans* e o efeito inibitório variou com a concentração e o tempo de contato.

O presente estudo demonstra a eficácia antibacteriana e antifúngica da solução fitoterápica Inphloral quase equivalente a NaOCl 2.5% nas mesmas concentrações.

NaOCl e Inphloral mostraram efeito antibacteriano semelhante às 1h e 2h de incubação, enquanto a CHX mostrou ser menos eficaz.

Assim os resultados justificam a realização de estudos in vivo da associação *Tea Tree oil e Petitgrain* (Inphloral) visando sua utilização como opção alternativa de uma solução auxiliar com potencial antimicrobiano para a desinfecção de canais na terapia endodôntica.

5. Conclusão

Atualmente as pesquisas estão mostrando maior interesse em produtos naturais. Pesquisas recentes sobre produtos fitoterápicos comprovaram que as ervas não são conhecidas apenas por seu sabor e fragrância, mas também por sua atividade antimicrobiana e valor medicinal.

Neste estudo in vitro os extratos de *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* (Inphloral), retirados da flora natural mostraram uma boa propriedade antibacteriana e antifúngica, sendo tão efetivo quando comparado com o hipoclorito de sódio 2,5%. Verificou-se que a solução *Tea Tree e Petitgrain* é eficaz na inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosas*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Candida albicans*, na forma planctônica.

O uso da solução fitoterápica de *Tea Tree e Petitgrain* como substância auxiliar do canal radicular pode ser ainda mais investigada, considerando as várias propriedades indesejáveis do NaOCl e da clorexidina, além de ter várias vantagens sobre o NaOCl, não é citotóxico, é biocompatível, de fácil disponibilidade, maior vida útil, não apresenta efeitos colaterais, nenhuma resistência microbiana descrita, bom sabor e cheiro dentre outros. No entanto, como este estudo foi um estudo in vitro, estudos in vivo de longo prazo para verificar a eficácia podem ser úteis para avaliar ainda mais a ação antimicrobiana dos extratos de *Tea Tree e Petitgrain* contra outros microrganismos presentes nos canais radiculares.

Seus efeitos nas propriedades físicas da dentina radicular devem ser avaliados. Sua profundidade de penetração nos túbulos dentinários também deve ser avaliada usando os métodos disponíveis.

A pesquisa nessas áreas pode progredir ainda mais, com um estudo clínico de longo prazo sobre se a solução de extrato de *Tea Tree* e *Petitgrain*, pode erradicar totalmente a carga microbiana e o *smear layer* do sistema de canal radicular, permitindo-nos desenvolver um regime de longo prazo para seu uso.

No entanto, com o conhecimento detalhado que adquirimos com este estudo, podemos usar a solução de extrato de *Tea Tree* (*Melaleuca alternifolia*) e *Petitgrain* (*Citrus aurantium*) para reduzir o crescimento / carga microbiana.

Por outro lado, o digluconato de clorexidina ao 2% parecia ser apenas bacteriostático quando diluído, e sua eficácia deve ser mais investigada.

Agradecimentos

Os autores declaram não haver afiliação financeira (por exemplo, emprego, pagamento direto, participações acionárias, retentores, consultorias, acordos de licenciamento de patentes ou honorários) ou envolvimento com qualquer organização comercial com interesse financeiro direto no assunto ou nos materiais discutidos neste manuscrito.

Bibliografia

- Luc W.M. van der Sluis, Bram Verhaagen, Ricardo Macedo, and Michel Versluis, *The Role of Irrigation 3 in Endodontics*, Springer International Publishing Switzerland 2016.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 20, 340 – 9
- Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod* 2013; 39: 712-718.
- Vieira AR, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Lopes WS. Dentine tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod* 2012; 38: 250-254.
- Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: A review. *Aust Endod J* 2009; 35: 131-139.
- Stephen Cohen, et al, *Cohen Caminhos da pulpa*, 2011 Elsevier Editora Ltda.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985; 11:525–8.
- Russell AD. Activity of biocides against mycobacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1996;25:87S–101S.
- Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993;25: 229–38.
- Maud Guivarc’h, Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review (*J Endod* 2017;43:16–24).
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985;11:525.
- Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993;25: 229–38.
- Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994; 20:276-8.
- Bernardi A, Teixeira CS. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. *Quintessence Int.* 2015 Jul-Aug;46(7):575-82. doi: 10.3290/j.qi.a33934. PMID: 25918757.
- Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994;20:276-8.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). 2000. *Braz J Med Biol Res* 33: 179–189.
- Kumar G, Jalaluddin M, Rout P, Mohanty R, Dileep CL. 2013. Emerging trends of herbal care in dentistry. *J Clin Diagn Res.* 7:1827–1829.
- Sinha DJ, Sinha AA. 2014. Natural medicaments in dentistry. *Ayu.* 35:113–118.
- Pujar M, Makandar SD. 2011. Herbal usage in endodontics- a review. *Int J Contem Dent.* 2:34–37.
- Camila de Melo Aleluia, Viviane de Cássia Procópio, Marília Terezinha Gonçalves Oliveira. FITOTERÁPICOS NA ODONTOLOGIA.
- Mota, I. B. de O., Cunha, L. S., Braga, L. L. A., Lima, C. C., & Dietrich, L. (2018). Fitoterapia na odontologia: levantamento dos principais produtos fitoterápicos usados para a saúde bucal. *psicologia e saúde em debate*, 4(suppl1), 71
- <http://www.inphloral.com.br>
- Gu L, Kim JR, Ling J, et al. Review of contemporary irrigant agitation techniques and
- Kuruvilla JR, Kamath P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998; 24:472–6.
- JOSÉ F. SIQUEIRA JR e ISABELA N. RÔÇAS. *Microbiologia e Tratamento de Infecções Endodônticas*
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):488-98. doi: 10.1097/01.don.0000157990.86638.49. PMID: 15980706
- Haapasalo M., Udnæs T., Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod. Top.* 2003; 6:29–56. doi: 10.1111/j.1601-1546.2003.00041.x.
- Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Ghodse Hosseini MR. Presence of *Candida Albicans* in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions. *Iran Endod J.* 2007 Spring;2(1):24-8. Epub 2007 Apr 1. PMID: 24348654; PMCID: PMC3863409.
- 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. PMID: 24651335.

APÊNDICE 2

Resumo apresentado no congresso da IADR 2020



**Effectiveness of a Phytotherapeutic Irrigant Solution
Against *Enterococcus faecalis***

K.V. Ballesteros, R.L. Brasil, L.A. de Oliveira, L.P. Salles

Dentistry School, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UnB), Brazil



0842

Objectives:

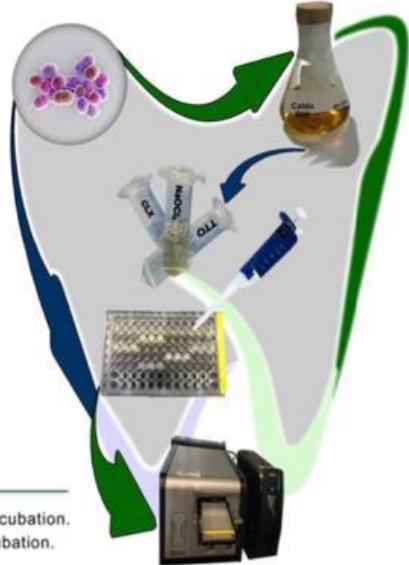
The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the antibacterial activity of a tea tree oil based irrigating solution on *Enterococcus faecalis* in planktonic form compared to sodium hypochlorite and chlorhexidine.

Methods:

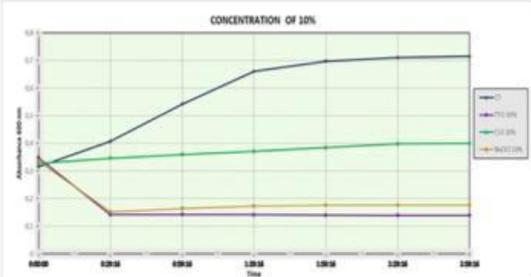
Enterococcus faecalis (ATCC 29212) was inoculated in Brain Heart Infusion Medium (BHI) at sterile 96-well cell culture plates with tea tree oil-based solution (TTO), 2% chlorhexidine gluconate (CLX) or 2.5% hypochlorite (NaOCl₂). Unexposed *Enterococcus faecalis* were the control group (CT). All root canal irrigants were added to the bacteria culture at different dilutions of 10%, 25%, 50%, and 90%. The bacterial growth was evaluated using Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (600nm) at 37°C, with measurements taken every 30 minutes for 6 hours to establish the growth-curve. The experiments were repeated 3 times independently. Statistics: ANOVA, Bonferroni post-test (n=9/group, p<0.05).

Results:

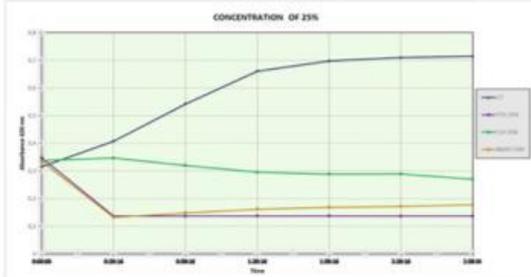
The results showed similar anti-bacterial effect for TTO and NaOCl₂ at 1h and 6h of incubation. CLX group was statistically less effective than the other groups at the first hour of incubation.



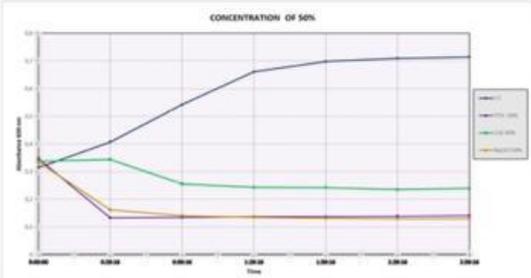
CONCENTRATION OF 10%



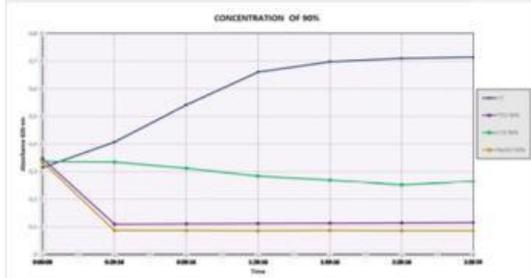
CONCENTRATION OF 25%



CONCENTRATION OF 50%



CONCENTRATION OF 90%



Conclusions:

The Tea Tree Oil-based root canal irrigant showed an interesting effect over *Enterococcus faecalis* in this study. On the other hand, 2% chlorhexidine gluconate seemed to be just bacteriostatic when diluted, and its effectiveness should be further investigated.



Programa de Pós-Graduação em Odontologia



IADR
International Association
for Dental Research

