

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/03/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Patrícia Conde Vital

**Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações
intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Patrícia Conde Vital

Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, na Área de Endodontia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2018

Vital, Patrícia Conde

Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais / Patrícia Conde Vital. – Araraquara: [s.n.], 2018
55 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Análise microbiológica 2. Hidróxido de cálcio 3. Óleos voláteis
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Patrícia Conde Vital

Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof^ª. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof^º. Dr^º. Guilherme Ferreira da Silva

3º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara, 28 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Patrícia Conde Vital

NASCIMENTO: 24.05.1992 – Botucatu/SP

FILIAÇÃO: Paulo Sérgio Vital e Laura Inês Conde Vital

2010 – 2015 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP/USP)

2016 – 2018 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP)

2017 – atual Curso de Especialização em Endodontia pela Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, SP.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)*, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-reitor Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa da sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e Vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves Campos.

Ao *Departamento de Odontologia Restauradora* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Juliane M. Guerreiro Tanomaru e Vice-chefe Prof. Dr. Milton Carlos Kuga.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia*, coordenado pelo Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli.

À minha orientadora do Mestrado *Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru*, pela orientação, apoio, confiança e pelo empenho dedicado na elaboração desse projeto.

Aos meus colegas de Pós-graduação e a Pós-doutoranda *Dra. Gisselle Moraima Chávez Andrade* pela colaboração.

A *CAPES* pela concessão das bolsas de estudos.

Vital PC. Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Micro-organismos resistentes dificultam a atuação de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio. Óleos essenciais podem ser usados para aumentar a atividade antimicrobiana. O objetivo do presente estudo foi avaliar o pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio (HC) associadas aos óleos essenciais, *Lemongrass* e *Thyme*, em comparação às associações com clorexidina (CLX) e paramonoclorofenol canforado (PMCC). As medicações intracanal (MICs) avaliadas foram: Calen® + *Lemongrass* (HC-LE), Calen® + *Thyme* (HC-TH), Calen® (HC), Calen PMCC® (HC-PMCC) e Calen® + CLX (HC-CLX.) O estudo foi dividido em duas publicações. **Publicação 1-** avaliou o pH e a atividade antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*. O pH foi avaliado nos períodos de 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A efetividade antibacteriana foi avaliada após contaminação por 21 dias dos canais radiculares de dentes humanos extraídos. Foram realizadas 3 coletas para a contagem de UFC mL⁻¹: C1- após contaminação, C2- após 7 dias com MICs e C3- após 7 dias da remoção das MICs. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$). Maior pH ocorreu nos períodos iniciais (12 h - 7 dias). Todas as MICs promoveram pH alcalino sem diferença entre elas ($p<0,05$). Todas as MICs avaliadas demonstraram atividade antibacteriana. No entanto, associações aos óleos essenciais demonstraram menor contagem bacteriana de proximadamente 10,57% em comparação ao controle positivo (sem MIC). **Publicação 2-** avaliou a capacidade de difusão de íons hidroxila e a atividade antibiofilme sobre *E. faecalis*. A difusão de íons hidroxila em dentina bovina foi avaliada após preenchimento de canais radiculares com as MICs e mensuração do pH nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A avaliação da atividade antibiofilme foi realizada por meio do teste de contato direto sobre *E. faecalis* utilizando blocos de dentina radicular bovina. A análise foi realizada pela contagem de UFC mL⁻¹. Os dados foram analisados estatisticamente por meio dos testes ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). HC-PMCC apresentou maior pH no período de 1 dia que as demais MICs ($p<0,05$). A partir de 14 dias, as MICs não apresentaram diferença estatística significativa entre elas ($p>0,05$). Todas as MICs promoveram diminuição da contagem bacteriana sobre biofilme de *E. faecalis* em comparação ao controle positivo, com destaque para as associações com LE e TH que mostraram maior redução ($p<0,0001$). Conclui-se que a adição dos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme* mantem o pH alcalino do HC (Calen®), sendo similar às associações com CLX e PMCC e promove maior efetividade antibacteriana ex vivo contra *E. faecalis*. Os óleos essenciais não impedem a capacidade de difusão de íons hidroxila das MICs à base de HC, mantendo o pH alcalino e são capazes de atuar sobre biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: Análise microbiológica. Hidróxido de cálcio. Óleos voláteis.

Vital PC. Evaluation of pH and antimicrobial/antibiofilm activity of novel intracanal medications based on calcium hydroxide associated with essential oils [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Resistant microorganisms make it difficult the activity of intracanal calcium hydroxide-based medications. Essential oils can be used to increase their antimicrobial effectiveness. The aim of the present study was to evaluate the pH and antimicrobial/antibiofilm activity of intracanal calcium hydroxide (CH) - based medications associated with essential oils, *Lemongrass* and *Thyme*, in comparison to combinations with chlorhexidine (CHX) and camphorated mono-parachlorophenol (CMCP). The intracanal medications (IMs) evaluated were: Calen® + *Lemongrass* (CH-LE), Calen® + *Thyme* (CH-TH), Calen® (CH), Calen CMCP® (CH-CMCP) and Calen® + CHX (CH-CHX). The study was divided into two publications. **Publication 1-** aims to evaluate the pH and antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. The pH was evaluated in the periods of 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. The antibacterial effectiveness was evaluated after contamination for 21 days of the root canals of extracted human teeth. Three samples were performed for counting of CFU mL⁻¹: S1- after contamination, S2- after 7 days with IMs, and S3- after 7 days of removal of IMs. Data were submitted to statistical analysis by ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn ($\alpha=0.05$). Higher pH occurred in the initial periods (12 h - 7 days). All IMs promoted alkaline pH with no difference between them ($p<0.05$). All IMs showed antibacterial activity. However, associations to essential oils showed lower bacterial counts about 10.57% in comparison to positive control (without IM). **Publication 2-** aims to evaluate the diffusion capacity of hydroxyl ions and the antibiofilm activity against *E. faecalis*. The diffusion of hydroxyl ions through the bovine dentin was evaluated after root canal filling with IMs and pH measurement at 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. The evaluation of the antibiofilm activity was performed by direct contact test on *E. faecalis* biofilm formed on bovine root dentin blocks. The analysis was performed by counting of CFU mL⁻¹. Data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$). CH-CMCP showed higher pH in 1 day than the other IMs ($p<0.05$). From 14 days, IMs did not present a significant statistical difference between them ($p>0.05$). All IMs were able to decrease the bacterial count on *E. faecalis* biofilm ($p>0.05$) compared to positive control, with emphasis on LE and TH associations ($p<0.0001$). It is concluded that the addition of *Lemongrass* and *Thyme* essential oils maintains the alkaline pH of CH (Calen®), being similar to CHX and CMCP associations and exhibiting ex vivo antibacterial effectiveness against *E. faecalis*. The essential oils do not interfere with the diffusion capacity of hydroxyl ion from intracanal CH-based medications, maintaining alkaline pH and they have an effect on *E. faecalis* biofilms.

Keywords: Microbiological analysis. Calcium hydroxide. Oils, volatile.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	12
2.1 Proposição Geral	12
2.2 Proposição Específica	12
3 PUBLICAÇÕES	13
3.1 Publicação 1	13
3.2 Publicação 2	25
4 DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A- METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 1	46
APÊNDICE B- METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 2	49
ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP)..	52
ANEXO B- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	55

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos representam o principal agente etiológico da necrose pulpar e da formação da lesão periapical¹. A persistência de micro-organismos no Sistema de Canais Radiculares (SCR) é a principal causa de fracasso do tratamento endodôntico²⁻⁴. A anatomia complexa do SCR dificulta a sua completa limpeza e desinfecção⁵.

A infecção endodôntica abriga uma microbiota polimicrobiana com espécies aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas organizada em biofilme^{3,5-8}. Biofilmes são comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, por exemplo, polissacarídeo e proteínas, na qual as células aderem-se umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces⁹⁻¹¹, apresentando grande resistência a antissépticos e antibióticos¹². A eliminação do biofilme e a destruição das bactérias do SCR são objetivos da desinfecção endodôntica¹³. Mesmo após o preparo biomecânico, os biofilmes podem permanecer no interior dos canais radiculares¹⁴⁻¹⁶.

Enterococcus faecalis é um coco Gram-positivo que apresenta maior resistência aos antimicrobianos, sendo capaz de sobreviver nos túbulos dentinários e reinfetar o canal radicular após obturação^{17,18}. É o micro-organismo de maior prevalência em dentes com insucesso de tratamento¹⁹, onde o retratamento é indicado²⁰⁻²². Diferentes cepas de *E. faecalis* podem interagir sinergicamente ou antagonicamente com um consórcio de bactérias do SCR. Os possíveis mecanismos que explicam essa interação é a produção de diferentes níveis de proteases, bem como possíveis diferenças de fatores de virulência²³.

As medicações intracanal (MICs) atuam de forma complementar ao preparo biomecânico na desinfecção do SCR^{24,25}. Por apresentar excelentes propriedades biológicas e atividade antimicrobiana, o hidróxido de cálcio (HC) é amplamente utilizado²⁶. Além disso, apresenta capacidade de dissolver tecido orgânico²⁷, inibir a reabsorção dentária e induzir a formação de tecido duro²⁸, estimular a proliferação de osteoblastos²⁹ e inativar endotoxinas bacterianas³⁰. A difusão dos íons hidroxila através dos túbulos dentinários e da superfície externa da raiz é responsável pelo efeito antimicrobiano do HC³¹. Estes íons são radicais livres com alto poder de reatividade³² e capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir sua atividade celular³³.

O HC apresenta menor efetividade frente à espécie *E. faecalis*, que é um micro-organismo resistente a diversos agentes antimicrobianos^{34,35}. Desta forma, a sua associação com outros antimicrobianos é proposta para aumentar seu espectro de ação, como paramonoclorofenol canforado (PMCC)³⁶⁻³⁸ e clorexidina (CLX)^{39,40}. A associação ao PMCC

não interfere nas propriedades do HC³⁶, amplia o espectro antimicrobiano^{36,37} e forma um composto chamado de paramonoclorofenolato de cálcio, responsável pela liberação prolongada de íons cálcio e hidroxila⁴¹.

A CLX é uma bisbiguanida catiônica, que apresenta ampla ação antimicrobiana⁴² e substantividade⁴³. Ela tem sido utilizada como solução irrigadora e MIC em endodontia. A CLX apresenta boa atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos⁴⁴. A CLX já foi estudada como MIC isoladamente^{45,46}, ou em associação a outras substâncias⁴⁵⁻⁴⁷, e os estudos demonstram o efeito sinérgico da CLX quando associada ao HC^{45,47}.

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e/ou seus componentes em relação a patógenos humanos e animais têm sido estudadas^{48,49}. O gênero *Thymus vulgaris* abrange inúmeras espécies e variedades, que tiveram seus óleos essenciais estudados, como por exemplo, o tomilho (conhecido como *Thyme* em inglês)^{50,51}. O óleo essencial de *Thyme* (rico em *timol*, apresentando vestígios de *carvacrol*) é cientificamente reconhecido pelas suas ações potentes bactericidas e fungicidas⁵². Tomilho e *carvacrol* demonstram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*⁵³, além de atividade antibiofilme⁵⁴. Estas substâncias apresentam capacidade de danificar a integridade da membrana plasmática, afetando o pH intra-celular e o equilíbrio iônico do citoplasma⁵⁵. O óleo essencial de tomilho demonstra atividade antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas, entre elas *E. faecalis*⁵⁶. Além disso, demonstra ter capacidade significativa de não gerar resistência antimicrobiana à esse micro-organismo⁵⁶.

A espécie *Cymbopogon citratus*, pertencente à família *Poaceae* (gramíneas), é conhecida por mais de 20 nomes, entre estes *Lemongrass*, erva perfumada e erva cidreira⁵⁷. O uso econômico mais expressivo de *C. citratus* é a produção de seu óleo essencial, rico em citral, e amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos⁵⁷. A atividade antibacteriana de óleo de *C. citratus* ocorre principalmente em função da presença de alfa e beta citral⁵⁸. O óleo essencial de *Lemongrass* foi avaliado sobre 5 cepas (2 MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina e 3 MRSA - *S. aureus* resistentes à meticilina) demonstrando a sua capacidade de interromper a formação de biofilme, bem como promover sua desestruturação⁵⁹. As soluções de óleos essenciais de *Lemongrass* e *Thyme* promovem redução do biofilme de *Aeromonas hydrophila* formado em superfícies de aço inoxidável⁶⁰.

A eliminação de micro-organismos resistentes ainda hoje é um grande desafio na terapia endodôntica. Deste modo, é necessária a avaliação de novas substâncias que

possibilitem maior efetividade de medicações à base de HC, como pela sua associação aos óleos essenciais.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- a. As associações dos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme* mantem o pH alcalino das MICs à base de HC, e apresentam atividade antibacteriana contra *E. faecalis*.
- b. Todas as MICs (HC, HC-PMCC, HC-CLX, HC-LE e HC-TH) foram capazes de diminuir a contagem bacteriana após 7 dias de remoção das mesmas. No entanto, foi observada menor contagem bacteriana para associação do HC aos óleos de *Lemongrass* e *Thyme* (HC-LE e HC-TH, respectivamente).
- c. As associações dos óleos essenciais *Thyme* e *Lemongrass* não impedem a capacidade de difusão em dentina de íons hidroxila da MIC à base de HC em dentina radicular bovina, mantendo o pH alcalino.
- d. Óleos essenciais em associação com MIC à base de HC demonstraram eficácia sobre biofilme de *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS*

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20(1): 340-9.
2. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 348-81.
3. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006; 39(4): 249-81.
4. Siqueira JF, Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J.* 2003; 36(7): 453-63.
5. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.
6. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990; 16(12): 580-8.
7. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987; 13(1): 29-39.
8. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics.* 2003; 6(1): 3-28.
9. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
10. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
11. Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human beta-defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod.* 2012; 38(3): 351-6.
12. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28(1): 12-55.
13. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2014; 40(2): 285-90.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

14. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(2): 231-52.
15. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012; 38(8): 1040-52.
16. Siqueira JFJ, Rôças IN, Ricucci D. Biofilm in endodontic infection. *Endod Topics* 2010; 22(1): 33-49.
17. Love RM. Bacterial adhesins--their role in tubule invasion and endodontic disease. *Aust Endod J.* 2002; 28(1): 25-8.
18. 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(2): 100-3.
19. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
20. Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 579-86.
21. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1): 1-11.
22. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(1): 86-93.
23. Chavez de Paz LE, Davies JR, Bergenholtz G, Svensater G. Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. *Int Endod J.* 2015; 48(10): 916-25.
24. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1(5): 170-5.
25. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, da Silva LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002; 28(4): 295-9.
26. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011; 44(8): 697-730.
27. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988; 14(3): 125-7.

28. Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J.* 2008; 41(11): 933-8.
29. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod.* 2006; 32(12): 1142-5.
30. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36(11): 733-9.
31. Andreasen J, Christensen S. Relationship between calcium hydroxide pH levels in the root canals and periodontal healing after replantation of avulsed teeth. *Endod Topics.* 2006; 14(1): 93-101.
32. Tanomaru-Filho M, Sacaki JN, Faleiros FB, Guerreiro-Tanomaru JM. pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(1): 1-5.
33. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol.* 2007; 23(1): 21-5.
34. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35(3): 221-8.
35. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(4): 234-9.
36. Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22(12): 674-6.
37. Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007; 33(6): 667-72.
38. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2002; 28(2): 102-4.
39. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J.* 2003; 36(2): 100-5.
40. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35(9): 735-9.
41. Naumovich DB. Surface tension and pH of drugs in root canal therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963; 16(8): 965-8.

42. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 27(7): 452-5.
43. Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira Cda C, et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod.* 2012; 38(9): 1249-52.
44. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 89-102.
45. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009; 35(10): 1350-3.
46. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 411-8.
47. Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 311-6.
48. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94(3): 223-53.
49. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(6): 1914-20.
50. Onawunmi GO, Yisak WA, Ogunlana EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J Ethnopharmacol.* 1984; 12(3): 279-86.
51. Rota CM, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* 2008; 19(7): 681-7.
52. Essawi T, Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70(3): 343-9.
53. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(2): 308-16.
54. Nostro A, Sudano Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 4): 519-23.
55. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 453-62.
56. Melo AD, Amaral AF, Schaefer G, Luciano FB, de Andrade C, Costa LB, et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Can J Vet Res.* 2015; 79(4): 285-9.

57. Cardoso MJ, Carvalho Leal HW, Santos MX. Estabilidade de cultivares de milho no Estado do Piauí. *Rev Cient Rural* 2000; 5(1): 62-7.
58. Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. 2010; 21(4): 549-53.
59. Adukwu EC, Allen SC, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(5): 1217-27.
60. Millezi AF, Cardoso M, Alves E, Piccoli RH. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Braz J Microbiol*. 2013; 44(1): 73-80.
61. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004; 30(4): 218-9.
62. Ercan E, Dalli M, Dulgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(2): e27-31.
63. Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, de Martin AS, Gomes BP, Motta RH, et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *Eur J Dent*. 2011; 5(1): 1-7.
64. Sienkiewicz M, Lysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb Drug Resist*. 2012; 18(2): 137-48.
65. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol*. 2013; 145(3): 686-98.
66. Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine*. 2015; 22(6): 657-65.
67. Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J Appl Microbiol*. 2010; 109(4): 1139-49.
68. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.
69. Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio M, Lopez ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci*. 2004; 46(2): 107-11.
70. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol*. 2012; 28(4): 320-3.
71. Rivas L, McDonnell MJ, Burgess CM, O'Brien M, Navarro-Villa A, Fanning S, et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol*. 2010; 139(1-2): 70-8.

72. Abbaszadegan A, Sahebi S, Gholami A, Delroba A, Kiani A, Iraj A, et al. Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*. *J Investig Clin Dent*. 2016; 7(1): 93-101.
73. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999; 86(6): 985-90.