

Atendendo a solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese/dissertação
será disponibilizado somente a partir de
07/12/2023.

At the author's request, the full text of
this thesis/dissertation will not be
available until Dec 07, 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

THAÍS DA SILVA ALVES SANTOS

**EFEITOS SINÉRGICOS ANTIMICROBIANOS DA COMBINAÇÃO
DOS EXTRATOS DE SÁLVIA E ALÇAÇUZ SOBRE CEPAS
CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium***

THAÍS DA SILVA ALVES SANTOS

**EFEITOS SINÉRGICOS ANTIMICROBIANOS DA COMBINAÇÃO DOS
EXTRATOS DE SÁLVIA E ALÇAÇUZ SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE
Enterococcus faecalis E *Enterococcus faecium***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos clínicos e laboratoriais de materiais e técnicas endodônticas.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Thaís da Silva Alves

Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação dos extratos de sálvia e alcaçuz sobre cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* / Thaís da Silva Alves Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
66 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Cláudio Antonio Talge Carvalho.

1. *Enterococcus*. 2. Biofilme. 3. Sinergismo. 4. Extratos naturais. I. Carvalho, Cláudio Antonio Talge, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Claudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Professora Tit. Dra. Marcia Carneiro Valera

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe de Souza Matos

Universidade Federal de Campina Grande

Campus de Campina Grande

Profa. Dra. Gleyce Olivera Silva

Universidade Anhanguera

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Miguel Christian Castillo Marin

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 07 de dezembro de 2022.

DEDICATÓRIA

A Deus, que iluminou meu caminho durante esta caminhada.

À memória de ***Eliza Eduardo da Silva***, minha amada avó.

Agradecimentos especiais

Agradeço primeiramente **a Deus** pela sua infinita misericórdia.

À minha família, a qual permaneceu ao meu lado durante todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, **Vanilda e Jorge**, a minha irmã **Joice**, e ao meu marido **Luiz Felipe**, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu completasse essa jornada. Certamente, sem vocês, minhas conquistas não teriam o mesmo valor.

À minha filha, Elisa, sua doçura e inocência me incentivam ao melhor todos os dias.

Ao meu orientador, **Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, agradeço por ter depositado sua confiança em mim, me aceitando como orientada e permitindo que eu desenvolvesse este projeto. Agradeço a excelente convivência, sempre agradável e enriquecedora durante todos esses anos. Agradeço por todo ensinamento compartilhado. Agradeço o incentivo e apoio. Agradeço a paciência e prontidão frente as dificuldades enfrentadas. Agradeço o exemplo de profissional dedicado, respeitoso e simpático, que proporcionou durante todo o curso, um ambiente de trabalho muito agradável e estimulador.

À Prof.ª Tit. Marcia Carneiro Valera, por toda dedicação e conhecimento repartido comigo. Agradeço por todo profissionalismo e pelo bom exemplo de caráter e integridade ao longo desses anos.

À Prof.ª Luciane Dias de Oliveira, por toda disposição e auxílio durante a realização desse projeto. Agradeço todo conhecimento compartilhado sempre com muito entusiasmo. Agradeço o exemplo de uma profissional dedicada.

Agradecimentos

Ao *Instituto de Ciência e Tecnologia de São José doa Campos*, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP na pessoa da diretora **Profa. Assoc. Rebeca Di Nicoló** e do vice-diretor **Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho**.

Ao *Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora*, na pessoa do Coordenador **Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**. Meu muito obrigado. Sinto-me orgulhosa por ter feito parte deste programa.

À *CAPES* pela concessão de bolsa doutorado.

Aos professores da banca:

Prof. Dr. Felipe de Souza Matos, obrigado por aceitar fazer parte da composição de minha banca examinadora, contribuindo com seu conhecimento. Agradeço a amizade e convivência agradável durante meu mestrado.

Profa. Dra. Gleyce Olivera Silva, obrigado por aceitar fazer parte da composição de minha banca examinadora, contribuindo com seu conhecimento. Agradeço por todo apoio e exemplo de ótima professora. Agradeço também pela amizade e convivência agradável nas clínicas durante o curso.

Prof. Dr. Miguel Christian Castillo Marin, obrigado por aceitar fazer parte da composição de minha banca examinadora, contribuindo com seu conhecimento. Agradeço a amizade e a disposição em me ajudar em inúmeros momentos durante o primeiro ano do meu mestrado. Agradeço o excelente exemplo de profissional clínico e acadêmico.

Prof.^a Tit. Marcia Carneiro Valera, obrigado por aceitar novamente fazer parte da composição de minha banca examinadora. Agradeço por toda contribuição em meu projeto no exame geral de qualificação.

Agradeço ao **Prof. Assoc. Cesar Rogerio Pucci** por todo incentivo e apoio desde a graduação. Suas ações foram extremamente importantes para minha decisão em seguir carreira acadêmica. Muito obrigada!

À professora, **Ana Paula Martins Gomes**, pelo convívio desde minha graduação. Obrigado pelo exemplo de profissional íntegra e amável.

Agradeço a **Thaís Cristine Pereira** e **Vanessa Marques Meccatti**. Agradeço por todo apoio, toda ajuda e paciência. Graças a vocês algo que era novo e difícil, tornou-se possível de maneira tranquila e agradável. Agradeço por todo tempo que dividimos no laboratório.

Aos colegas e amigos, **Amjad Abu Hasna, Bruna Jordão, Caroline T. Rocha, Felipe B. Moura, Giovanna Minhoto, Mariana G. Gimenez** e **Rayana Khoury** que compartilharam comigo esses anos de curso. Agradeço por termos dividido experiências e bons momentos.

Aos funcionários e amigos do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos: Josiana Carneiro, Evelyn e Liliane, do Departamento de Odontologia Restauradora; **Carolina, e Sandra**, da Secretaria de Pós-Graduação; **Carlos Guedes**, do Escritório de Apoio à Pesquisa. Obrigado pela disponibilidade em ajudar sempre que possível.

A **todos** aqueles que direta e indiretamente auxiliaram na realização deste projeto

*“ Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis
a nós mesmos.”
(Friedrich Nietzsche)*

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Infecção Endodôntica	16
2.2 Utilização de extratos naturais na Odontologia.....	19
2.3 Sinergismo	22
3 PROPOSIÇÃO	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Extratos e associações	27
4.2 Atividade antimicrobiana das associações dos extratos	27
4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos isolados.....	27
4.4 Método de microdiluição <i>Checkerboard</i> das associações dos extratos.....	29
4.5 Atividade antibiofilme das associações sinérgicas dos extratos	32
4.6 Análise estatística	34
5 RESULTADO	35
5.1 Determinação da CIM e da CMM.....	35
5.2 Avaliação das associações dos extratos de <i>S. officinalis</i> e <i>G. glabra</i>	36
5.3 Atividade antibiofilme das associações sinérgicas dos extratos	37
5.3.1 Efeito das combinações dos extratos sobre biofilme de <i>E. faecium</i>	38
5.3.2 Efeito das combinações dos extratos sobre biofilme de <i>E. faecalis</i>	43
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

Santos TSA. Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação dos extratos de sálvia e alcaçuz sobre cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

A crescente busca pelo conhecimento do potencial biológico presente nas plantas medicinais tem estimulado pesquisas, principalmente no que diz respeito ao potencial antimicrobiano dos extratos de plantas. Entretanto, mais estudos sobre os efeitos sinérgicos da combinação desses extratos são fundamentais para sua maior aplicação clínica. O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos sinérgicos antimicrobianos das associações dos extratos naturais de *Salvia officinalis* (*S. officinalis*) e *Glycyrrhiza glabra* (*G. glabra*). Foi realizada a análise antimicrobiana sobre três cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), duas cepas clínicas de *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) e uma cepa padrão de cada espécie. Foram determinadas as Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) por microdiluição em caldo com semeadura, e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) pela técnica *checkerboard*. Para avaliar o efeito combinado dos extratos sobre biofilme foram utilizadas duas combinações dos extratos sobre biofilme formado de *E. faecalis* e sobre biofilme formado de *E. faecium*, por dois períodos diferentes: 5 minutos e 24 h, e foram avaliados os valores médios de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). A análise estatística foi feita aplicando método ANOVA e teste de Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn (significância de 5%). Os extratos de *S. officinalis* e *G. glabra* apresentaram concentração microbicida para as cepas avaliadas. A combinação dos extratos apresentou valores indiferentes (ICIF > 0,5 e ≤ 4) para as cepas de *E. faecium*, e valores indiferentes e sinérgicos (ICIF ≤ 0,5) para cepas de *E. faecalis*. Sobre biofilme as duas combinações apresentaram reduções estatisticamente significantes do grupo controle negativo ($p < 0,05$). Dessa forma concluiu-se que a combinação dos extratos de *S. officinalis* e *G. glabra* possui efeito sinérgico antimicrobiano contra *E. faecalis* e atividade antibiofilme contra *E. faecalis* e *E. faecium*.

Palavras-chave: Enterococcus. Biofilme. Sinergismo. Extratos naturais.

Santos TSA. Synergistic antimicrobial effects of the combination of sage and licorice extracts on clinical strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

The growing search for knowledge of the biological potential present in medicinal plants has stimulated research, especially with regard to the effective antimicrobial potential of plant extracts, however, further studies on the synergistic effects of the combination of these extracts is essential for their greater clinical application. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the synergistic antimicrobial effects of the association of natural extracts of *Salvia officinalis* (*S. officinalis*) and *Glycyrrhiza glabra* (*G. glabra*). Antimicrobial analysis was performed on three clinical strains of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), two clinical strains of *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) and one standard strain of each species. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (MMC) were determined by microdilution in broth with seeding, and Fractional Inhibitory Concentration Index by the checkerboard technique. To evaluate the combined effect of extracts on biofilm, two combinations of extracts on biofilm formed by *E. faecalis* and on biofilm formed by *E. faecium* were used, for two different periods: 5 min and 24 h, and the mean values of units were evaluated. colony forming agents per milliliter (CFU/mL). Statistical analysis was performed using the ANOVA method and Tukey's or Kruskal-Wallis and Dunn's test (5% significance). The extracts of *S. officinalis* and *G. glabra* showed microbicidal concentration for the strains evaluated. The combination of extracts showed indifferent values ($FICI > 0.5$ and ≤ 4) for *E. faecium* strains, and indifferent and synergistic values ($FICI \leq 0.5$) for *E. faecalis* strains. On biofilm, the two combinations showed statistically significant reductions compared to the negative control group ($p < 0.05$). Thus, it is concluded that the combination of extracts of *S. officinalis* and *G. glabra* has synergistic antimicrobial effect against *E. faecalis* and antibiofilm activity against *E. faecalis* and *E. faecium*.

Keywords: *Enterococcus*. Biofilm. Synergism. Extracts plants.

1 INTRODUÇÃO

Obtidos exclusivamente por meio da utilização de matérias-primas ativas vegetais, os fitoterápicos são medicamentos que não incluem em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, bem como associações destas com extratos vegetais (Anvisa, 2014). O aumento na demanda por novos fármacos intensificou o número de pesquisas em prol da medicina alternativa, principalmente no que diz respeito às funções dos compostos químicos existentes em espécimes vegetais. Neste cenário os medicamentos fitoterápicos têm sua utilização reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), onde sua eficácia e ausência de riscos à saúde são comprovados em estudos toxicológicos, etnofarmacológicos e documentação científica indexada (Anvisa, 2014).

A crescente busca pelo conhecimento do potencial biológico presentes nas plantas medicinais tem favorecido pesquisas. A literatura recente tem frequentemente demonstrado a eficácia tanto antimicrobiana quanto anti-inflamatória de inúmeros extratos de plantas (Falcão et al., 2018; Mehmood, Murtaza, 2018; Acquaviva et al., 2019; Oliveira et al., 2019). Nesse contexto o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais, que possam sanar as necessidades presentes no mercado, como resistência antimicrobiana, alto custo e difícil acesso, torna-se fundamental.

A eficácia antimicrobiana do extrato de *Curcuma longa* L. a 1%, quando utilizado como irrigante subgengival, foi comprovada contra patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) (Jalaluddin et al., 2019). As atividades antibacteriana e antibiofilme do extrato de casca de noqueira contra estafilococos também foram comprovadas na literatura, demonstrando que o extrato apresentou atividade antibacteriana satisfatória e reduziu significativamente a biomassa do biofilme e a viabilidade celular de maneira dose-dependente (Acquaviva et al., 2019). Outro extrato que teve sua atividade antibacteriana evidenciada foi o extrato de chá verde solúvel em água sobre quarenta e três cepas isoladas hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). As concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas

mínimas médias do extrato encontradas contra todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram 2,06 +/- 1,76 e 2,54 +/- 2,22 mg/mL (-1) respectivamente, sugerindo que o extrato de chá verde possui atividade bactericida significativa em cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* Jazani et al. (2007). Em 2018 os efeitos inibitórios (antibacterianos e antibiofilmes) do extrato de *Juglans regia* L. na formação do biofilme de *P. aeruginosa* e foram investigados e foi observado que, em várias concentrações, o extrato de *J. regia* L pode fornecer uma alternativa para o controle de infecções relacionadas ao biofilme causadas por *P. aeruginosa* (Dolatabadi et al., 2018).

No que diz respeito a micro-organismos de importância odontológica, a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de extratos de plantas também tem sido evidenciada. Akhalwaya et al. (2018) avaliaram as maiores propriedades antiaderentes contra a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (reduzido em 97,56%) de extratos de plantas medicinais sul-africanas utilizadas tradicionalmente para tratar infecções orais. Oliveira et al. (2017) demonstraram o efeito antimicrobiano do extrato de *R. officinalis* L (alecrim) sobre biofilmes monomicrobianos de *Candida albicans* (*C. albicans*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *S. mutans* e *P. aeruginosa* e biofilmes polimicrobianos compostos por *C. albicans*. Ainda o extrato de *R. officinalis* L também forneceu viabilidade celular acima de 50% ($a \leq 50$ mg/mL) e mostrou efeito anti-inflamatório, não sendo também genotóxico. Xiao et al. (2018) avaliaram os efeitos da curcumina na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeos em fibroblastos gengivais (*in vitro*) e na periodontite experimental induzida (*in vivo*) e concluíram que a curcumina reduziu significativamente a inflamação gengival e modulou a perda de fibra colágena e osso alveolar *in vivo*. (Oliveira et al., 2017; Akhalwaya et al., 2018; Xiao et al., 2018).

A *Salvia officinalis* (*S. officinalis*), popularmente conhecida como sálvia, salva comum ou salva ordinária, é um vegetal herbáceo, perene que floresce no verão do Hemisfério Sul e é comumente utilizado como condimento. Suas atividades farmacológicas têm sido amplamente estudadas visando sua utilização como agente fitoterapêutico (Alexa et al., 2016; Lopresti, 2017). Isto se deve às suas propriedades biológicas benéficas, que incluem efeitos antioxidantes demonstrados com eficiência maior do que a encontrada em compostos antioxidantes padrão

(Kolak et al., 2009), ação antifúngica, evidenciada pela inibição da síntese da parede celular e aumento da permeabilidade da membrana de *C. albicans* (Lee, Kim, 2016); e ação anticancerígena com efeitos antiproliferativos (Al-Kalaldehy et al., 2010; Nicolella et al., 2014). A sálvia ainda apresenta abrangente atividade antimicrobiana, com espectro de ação compreendendo tanto bactérias Gram-positivas como *E. faecalis*, *S. mutans* e *S. aureus* (Oliveira Jr et al., 2019; Hassan et al., 2020), quanto bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) e *Salmonella Enteritidis* (*S. Enteritidis*) (Hemeg et al., 2020; Fathi et al., 2021).

Outro fitoterápico que merece destaque é *Glycyrrhiza glabra* (*G. glabra*), pertence à família Fabaceae, originária de áreas mediterrâneas e popularmente conhecida como alcaçuz. Suas raízes e rizomas são tipicamente utilizadas na medicina tradicional (Armanini et al., 2002; Rizzato et al., 2017). Estudos recentes demonstram extratos fito-complexos de *G. glabra* com eficiente atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*, por seu potente efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano (Wang et al., 2015). Ainda, propriedades antifúngicas do extrato de *G. glabra* foram evidenciadas contra *C. albicans* (Sharma et al., 2016). Testes microbiológicos *in vitro* evidenciaram o extrato de *G. glabra* como potente eficácia contra principais bactérias envolvidas na cárie dentária (Rai et al., 2020).

O gênero *Enterococcus* é constituído por diversas espécies, das quais *E. faecalis* e *Enterococcus. Faecium* (*E. faecium*) são responsáveis pela maioria das infecções (Leavis et al., 2006; Guzman et al., 2016). O número crescente de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos tem se tornado uma ameaça mundial à saúde, se destacando dentre estas *E. faecalis* e o *E. faecium* (Paulsen et al., 2003; Roca et al., 2015). Isto se deve principalmente ao fato de apresentarem resistência à vancomicina, um antimicrobiano, sendo assim classificados como enterococos resistentes à vancomicina (VRE). *E. faecium* e *E. faecalis* são responsáveis por aproximadamente 95% dos isolados de *Enterococcus* de culturas clínicas, e apenas algumas drogas como linezolida e uma combinação de quinupristina e dalfopristina são utilizadas clinicamente como alternativa para contornar sua resistência à vancomicina (McNeil et al., 2000; Rice, 2001; Orsi, Ciorba, 2013).

No processo de necrose pulpar, que pode ser advindo de um traumatismo dental, lesões cariosas ou até iatrogenias durante tratamento restaurador, ocorre a proliferação e colonização do sistema de canais radiculares por uma microbiota comensal oral (Kirkevang et al., 2007; Moreno et al., 2013). A infecção endodôntica primária possui um caráter polimicrobiano, com a presença de micro-organismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos (Siqueira, Rôças, 2009; Montagner et al., 2010; Rôças, Siqueira, 2010; Tennert et al., 2014). Podendo ser resultante de uma falha no tratamento endodôntico, a infecção endodôntica secundária ou persistente, é encontrada em canais radiculares tratados endodonticamente, apresentando uma microbiota menos diversificada em comparação à encontrada nos casos de infecção primária, com predominância de microrganismos anaeróbios facultativos Gram-positivos, como *E. faecalis* (Adib et al., 2004; Gomes et al., 2004; Tennert et al., 2014; Zhang et al., 2015). Dessa forma a permanência de *E. faecalis* no interior dos canais radiculares é frequentemente associada às infecções endodônticas persistentes (Dahlén et al., 2012). Em 2011, Andrade et al. analisaram a prevalência de *Enterococcus spp.* em 35 canais radiculares com necrose pulpar, sendo encontrados em 94% dos casos *E. faecalis* e em apenas 3% dos casos foram encontrados *E. faecium*. Apesar de ser responsável por uma menor porcentagem quando comparado ao *E. faecalis*, o número de infecções causadas por *E. faecium* tem crescido, tornando fundamental estudos que avaliem sua prevalência nos canais radiculares (Andrade et al., 2011; Murad et al., 2014; Ferreira et al., 2015). Machado et al. (2020) em um estudo para comparar a carga e a composição microbiana e determinar as concentrações de lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) encontradas na periodontite apical primária e na periodontite apical após tratamento de sessenta amostras coletadas do interior do canal radicular, detectaram o *E. faecalis* dentre as bactérias gram-positivas mais prevalentes na periodontite apical primária e ainda, a prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* na periodontite apical após tratamento (Machado et al., 2020).

Frente às inúmeras propriedades biológicas evidenciadas nos diferentes tipos de extratos existentes, bem como ao caráter polimicrobiano presente nas infecções que afetam o meio bucal faz-se também relevante uma análise do efeito

sinérgico provocado pela utilização de diferentes extratos juntos. Sendo assim esta pesquisa se justifica na necessidade de uma análise dos efeitos biológicos de extratos de plantas, inclusive na associação entre estes buscando um efeito sinérgico para ampliar seu efeito antimicrobiano, que possa desenvolver uma nova formulação para uso endodôntico apresentando dessa forma novas alternativas e/ou produtos que possam ampliar a terapia medicamentosa na Odontologia.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- a) Os extratos de *S. officinalis* e de *G. glabra* apresentaram ação antimicrobiana sobre cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*;
- b) Os extratos de *S. officinalis* e de *G. glabra* quando associados resultaram em combinações com efeito aditivo contra cepas de *E. faecium*, e efeito aditivo e sinérgico contra cepas de *E. faecalis*;
- c) Para ação antibiofilme contra ambas as espécies, *E. faecium* e *E. faecalis*, no período de contato por 5 min a combinação 1 mostrou redução mais efetiva do número de unidades formadoras de colônias. Já o contato por 24 h, apresentou-se mais efetivo na redução do número de unidades formadoras de colônias, tanto para combinação 1, quanto para combinação 2; revelando-se assim como melhor protocolo de tratamento.

REFERÊNCIAS*

- Acquaviva R, D'Angeli F, Malfa GA, Ronsisvalle S, Garozzo A, Stivala A, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of walnut pellicle extract (*Juglans regia* L.) against coagulase-negative staphylococci. *Nat Prod Res.* 2021 Jun;35(12):2076-81. doi: 10.1080/14786419.2019.1650352. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397177.
- Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004 Aug;37(8):542-51. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00840.x. PMID: 15230907.
- Ahmad I, Aqil F. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESbetaL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiol Res.* 2007;162(3):264-75. doi: 10.1016/j.micres.2006.06.010. Epub 2006 Jul 27. PMID: 16875811.
- Akhalwaya S, van Vuuren S, Patel M. An in vitro investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. *J Ethnopharmacol.* 2018 Jan 10;210:359-71. doi: 10.1016/j.jep.2017.09.002. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28888760.
- Alexa E, Sumalan RM, Danciu C, Obistioiu D, Negrea M, Poiana MA, et al. Synergistic antifungal, allelopathic and anti-proliferative potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. *Essential Oils Molecules.* 2018 Jan 16;23(1):185. doi: 10.3390/molecules23010185. PMID: 29337923; PMCID: PMC6017077.
- Al-Kalaldeh JZ, Abu-Dahab R, Afifi FU. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutr Res.* 2010 Apr;30(4):271-8. doi: 10.1016/j.nutres.2010.04.001. PMID: 20534330.
- Andrade AO, Scelza MFZ, Pinto SS, Guaraldi ALM, Hirata Jr R. Isolation and identification of *Enterococcus* sp in primary endodontic infections. *Rev Bras Odontol.* 2011 Jan/Jun; 68(1):20-4. doi: 10.18363/rbo.v68n1.p.20.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Regulamento de procedimentos para o registro de medicamentos fitoterápicos e registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília: Diário Oficial da União; 2014.
- Armanini D, Fiore C, Mattarello MJ, Bielenberg J, Palermo M. History of the endocrine effects of licorice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2002 Sep;110(6):257-61. doi: 10.1055/s-2002-34587. PMID: 12373628.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Arora S, Saquib SA, Algarni YA, Kader MA, Ahmad I, Alshahrani MY, et al. Synergistic effect of plant extracts on endodontic pathogens isolated from teeth with root canal treatment failure: an in vitro study. *Antibiotics (Basel)*. 2021 May 9;10(5):552. doi: 10.3390/antibiotics10050552. PMID: 34065139; PMCID: PMC8151008.

Awawdeh L, Jamleh A, Al Beitawi M. The antifungal effect of propolis endodontic irrigant with three other irrigation solutions in presence and absence of smear layer: an in vitro study. *Iran Endod J*. 2018 Spring;13(2):234-39. doi: 10.22037/iej.v13i2.19227. PMID: 29707021; PMCID: PMC5911300.

Ayari S, Shankar S, Follett P, Hossain F, Lacroix M. Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus* and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A. *Microb Pathog*. 2020 Apr;141:104008. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104008. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31991163.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig*. 2021 Apr;25(4):2017-27. doi: 10.1007/s00784-020-03510-2. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32860137.

Chovanová R, Mikulášová M, Vaverková S. In vitro antibacterial and antibiotic resistance modifying effect of bioactive plant extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Microbiol*. 2013;2013:760969. doi: 10.1155/2013/760969. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24222768; PMCID: PMC3810435.

Dahlén G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in *Enterococci* isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol*. 2012;4:10855. doi: 10.3402/jom.v4i0.10855.

Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, et al. Antibacterial properties of chitosan nanoparticles and propolis associated with calcium hydroxide against single- and multispecies biofilms: an in vitro and in situ study. *J Endod*. 2017 Aug;43(8):1332-36. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.017. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28578886.

Dolatabadi S, Moghadam HN, Mahdavi-Ourtakand M. Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog*. 2018 May;118:285-89. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.055.

Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):815-8. doi: 10.1016/j.joen.2007.02.016. Epub 2007 Apr 16. PMID: 17804318.

Eerdunbayaer, Orabi MA, Aoyama H, Kuroda T, Hatano T. Structures of new phenolics isolated from licorice, and the effectiveness of licorice phenolics on

vancomycin-resistant Enterococci. *Molecules*. 2014 Aug 25;19(9):13027-41. doi: 10.3390/molecules190913027. PMID: 25157467; PMCID: PMC6271213.

Falcão TR, de Araújo AA, Soares LAL, de Moraes Ramos RT, Bezerra ICF, Ferreira MRA, et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. *BMC Complement Altern Med*. 2018 Mar 9;18(1):84. doi: 10.1186/s12906-018-2144-6.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):824-30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031.

Fathi F, Sadrnia M, Arjomandzadegan M, Mohajerani HR. In vitro and in vivo evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of five ethnomedicinal plants against oral bacteria by TEM. *Avicenna J Phytomed*. 2021 Mar-Apr;11(2):180-89. PMID: 33907676; PMCID: PMC8051319.

Guarrera PM. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*. 2005 Jan;76(1):1-25. doi: 10.1016/j.fitote.2004.09.006. PMID: 15664457.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6. PMID: 14871344.

Grenier D, Marcoux E, Azelmat J, Ben Lagha A, Gauthier P. Biocompatible combinations of nisin and licorice polyphenols exert synergistic bactericidal effects against *Enterococcus faecalis* and inhibit NF- κ B activation in monocytes. *AMB Express*. 2020 Jul 6;10(1):120. doi: 10.1186/s13568-020-01056-w. PMID: 32632823; PMCID: PMC7338318.

Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J et al. Global emergence and dissemination of Enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front Microbiol*. 2016 May 26;7:788. doi: 10.3389/fmicb.2016.00788.

Hemeg HA, Moussa IM, Ibrahim S, Dawoud TM, Alhaji JH, Mubarak AS, et al. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi J Biol Sci*. 2020; 27(12): 3221-27.

Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*. 2007 Jun;30(6):1147-9. doi: 10.1248/bpb.30.1147. PMID: 17541170.

Horiuchi K, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Tsuchiya T. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol Pharm Bull*. 2007 Feb;30(2):287-90. doi: 10.1248/bpb.30.287. PMID: 17268067.

Hossain F, Follett P, Dang Vu K, Harich M, Salmieri S, Lacroix M. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food Microbiol.* 2016 Feb;53(Pt B):24-30. doi: 10.1016/j.fm.2015.08.006. Epub 2015 Aug 18. PMID: 26678126.

Jazani NH, Shahabi Sh, Ali AA. Antibacterial effects of water soluble green tea extracts on multi-antibiotic resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pak J Biol Sci.* 2007 May 1;10(9):1544-6.

Jalaluddin M, Jayanti I, Gowdar IM, Roshan R, Varkey RR, Thirutheri A. Antimicrobial activity of *Curcuma longa* L. extract on periodontal pathogens. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019 May;11(Suppl 2):S203-7. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_295_18.

Kolak U, Kabouche A, Oztürk M, Kabouche Z, Topçu G, Ulubelen A. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochem Anal.* 2009 Jul-Aug;20(4):320-7. doi: 10.1002/pca.1130. PMID: 19402189.

Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J.* 2007 Apr;40(4):290-9.

Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):454-60.

Lee HS, Kim Y. Antifungal activity of *salvia miltiorrhiza* against *Candida albicans* is associated with the alteration of membrane permeability and (1,3)- β -D-Glucan synthase activity. *J Microbiol Biotechnol.* 2016 Mar;26(3):610-7. doi: 10.4014/jmb.1511.11009. PMID: 26699747.

Liktor-Busa E, Kovács B, Urbán E, Hohmann J, Ványolós A. Investigation of Hungarian mushrooms for antibacterial activity and synergistic effects with standard antibiotics against resistant bacterial strains. *Lett Appl Microbiol.* 2016 Jun;62(6):437-43. doi: 10.1111/lam.12576. PMID: 27100065.

Lins RX, de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MA, Williams DW, et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *J Dent.* 2013 Sep;41(9):779-86. doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.004.

Lopresti AL. *Salvia* (Sage): A Review of its potential cognitive-enhancing and protective effects. *Drugs R D.* 2017;17(1):53-64. doi:10.1007/s40268-016-0157-5

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig.* 2020 Sep;24(9):3169-79. doi: 10.1007/s00784-019-03191-6. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31933111.

Marcoux E, Lagha AB, Gauthier P, Grenier D. Antimicrobial activities of natural plant compounds against endodontic pathogens and biocompatibility with human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2020 Aug;116:104734. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104734. Epub 2020 May 18. PMID: 32454322.

McNeil SA, Clark NM, Chandrasekar PH, Kauffman CA. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid after failure of treatment with synercid (quinupristin/dalfopristin). *Clin Infect Dis*. 2000 Feb;30(2):403-4. doi: 10.1086/313669. PMID: 10671355.

Mehmood A, Murtaza G. Phenolic contents, antimicrobial and antioxidant activity of *Olea ferruginea* Royle (Oleaceae). *BMC Complement Altern Med*. 2018 Jun 5;18(1):173. doi: 10.1186/s12906-018-2239-0.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1796-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.008.

Moreno JO, Alves FR, Gonçalves LS, Martinez AM, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Periradicular status and quality of root canal fillings and coronal restorations in an urban Colombian population. *J Endod*. 2013 May;39(5):600-4. doi: 10.1016/j.joen.2012.12.020.

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod*. 2014 Jul;40(7):899-906. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.010.

Nicolella HD, de Oliveira PF, Munari CC, Costa GFD, Moreira MR, Veneziani RCS, et al. Differential effect of manool--a diterpene from *Salvia officinalis*, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2014;72:8-12. doi: 10.1016 Oct/j.fct.2014.06.025. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25007786.

Nikkhah M, Hashemi M, Habibi Najafi MB, Farhoosh R. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *Int J Food Microbiol*. 2017 Sep 18;257:285-94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28763743.

Nishio Ayre W, Melling G, Cuveillier C, Natarajan M, Roberts JL, Marsh LL, et al. *Enterococcus faecalis* demonstrates pathogenicity through increased attachment in an ex vivo polymicrobial pulpal infection. *infect immun*. 2018 Apr 23;86(5):e00871-17. doi: 10.1128/IAI.00871-17. PMID: 29483293; PMCID: PMC5913860.

Oliveira JR, Vilela PGDF, Almeida RBA, de Oliveira FE, Carvalho CAT, Camargo SEA, et al. Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. *Gen Dent*. 2019 Jan-Feb;67(1):22-26.

Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SE, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as

analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2017 Mar;242(6):625-34. doi: 10.1177/1535370216688571.

Orsi GB, Ciorba V. Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. *Ann Ig*. 2013 Nov-Dec;25(6):485-92. doi: 10.7416/ai.2013.1948. PMID: 24284534.

Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Madheswaran T, Davamani F, Pichika MR, et al. Effect of propolis nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm in the root canal. *Molecules*. 2021 Jan 30;26(3):715. doi: 10.3390/molecules26030715. PMID: 33573147; PMCID: PMC7866495.

Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. 2003 Mar 28;299(5615):2071-4.

Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients with secondary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:198-203. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.02.013. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28249746.

Rai A, Tripathi AM, Saha S, Dhinsa K, Jain B, Yadav G. Comparison of antimicrobial efficacy of four different plant extracts against cariogenic bacteria: an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2020 Jul-Aug;13(4):361-367. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1796. PMID: 33149409; PMCID: PMC7586476.

Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*. 2001 Mar-Apr;7(2):183-7. doi: 10.3201/eid0702.010205. PMID: 11294702; PMCID: PMC2631700.

Rizzato G, Scalabrin E, Radaelli M, Capodaglio G, Piccolo O. A new exploration of licorice metabolome. *Food Chem*. 2017 Apr 15;221:959-68. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.068. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27979300.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):45-52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022.

Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*. 2015 Apr 16;6:22-9. doi: 10.1016/j.nmni.2015.02.007.

Salejda AM, Janiewicz U, Korzeniowska M, Kolniak-Ostek J, Krasnowska G. Effect of walnut green husk addition on some quality properties of cooked sausages. *LWT Food Sci Technol*. 2016; 65:751-7.

Sharma H, Yunus GY, Agrawal R, Kalra M, Verma S, Bhattar S. Antifungal efficacy of three medicinal plants *Glycyrrhiza glabra*, *Ficus religiosa*, and *Plantago major* against oral *Candida albicans*: a comparative analysis. *Indian J Dent Res*. 2016 Jul-Aug;27(4):433-36. doi: 10.4103/0970-9290.191895. PMID: 27723643.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.

Soleimanpour S, Sedighinia FS, Safipour Afshar A, Zarif R, Ghazvini K. Antibacterial activity of *Tribulus terrestris* and its synergistic effect with *Capsella bursa-pastoris* and *Glycyrrhiza glabra* against oral pathogens: an in-vitro study. *Avicenna J Phytomed*. 2015 May-Jun;5(3):210-7. PMID: 26101754; PMCID: PMC4469962.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014 May;40(5):670-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.005.

Veloso DJ, Abrão F, Martins CHG, Bronzato JD, Gomes BPFA, Higino JS, et al. Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2020 Feb;110:104585. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104585. Epub 2019 Nov 3. PMID: 31838294.

Xiao CJ, Yu XJ, Xie JL, Liu S, Li S. Protective effect and related mechanisms of curcumin in rat experimental periodontitis. *Head Face Med*. 2018 Aug 16;14(1):12. doi: 10.1186/s13005-018-0169-1.

Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection. *Iran J Microbiol*. 2019 Apr;11(2):120-28. PMID: 31341566; PMCID: PMC6635307.

Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1207-13. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.008.

Wang L, Yang R, Yuan B, Liu Y, Liu C. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Jul;5(4):310-5. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.005. Epub 2015 Jun 17. PMID: 26579460; PMCID: PMC4629