

*Jorgiana Sangalli*

**Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Associações de Extratos de Araçá (*Psidium cattleianum*) e Hidróxido de Cálcio frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans***

ARAÇATUBA – SP

2010

*Jorgiana Sangalli*

**Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Associações de Extratos de Araçá (*Psidium cattleianum*) e Hidróxido de Cálcio frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans***

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOPEDIATRIA.**

Orientador: Professor Eloi Dezan Júnior

Co-Orientador: Professor Elerson Gaetti Jardim Júnior

ARAÇATUBA – SP

2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S225a Sangalli, Jorgiana.  
Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de associações de extratos de Araçá (*Psidium cattleianum*) e hidróxido de cálcio frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* / Jorgiana Sangalli. - Araçatuba : [s.n.], 2010  
62f. : 6 il. ; 2 tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010  
Orientador: Prof. Eloi Dezan Júnior  
Co-orientador: Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior

1. Extratos vegetais 2. Hidróxido de Cálcio 3. *Enterococcus faecalis* 4. *Candida albicans*

Black D27  
CDD 617.645

## *Dados Curriculares*

---

### *Jorgiana Sangalli*

Nascimento: 03.02.1985 – Rondonópolis/MT

Filiação: Jorge Sangalli  
Bernardete Salton Sangalli

2004-2007: Curso de Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia “Professor Albino Coimbra Filho” da  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

2008-2010: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria  
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

*Dedicatória*

## **A Deus:**

Pela vida,

Por minha maravilhosa família,

Por estar ao meu lado em todos os momentos,

Por guiar meus passos,

Por me proteger e iluminar,

Por seu amor infinito...

## **AOS meus amados pais Jorge e Bernardete:**

Pela vida.

Pelo amor incondicional, que me faz forte para viver...

Pelo exemplo de coragem, honestidade e perseverança...

Pelo esforço para me dar sempre o melhor...

E por todas as minhas oportunidades e conquistas.

Vocês são os melhores presentes de Deus.

**Muito Obrigado.**

**Amo Muito Vocês!**

## **Ao meu irmão Jorge Augusto:**

Anjo e alegria em minha vida! Tenho você sempre no coração.  
Agradeço por você também ser o meu maior presente de Deus. Você simplesmente é um pedaço de mim.

**Amo Muito Você.**

## **Aos meus avós:**

Pelo carinho e amor.

À minha querida avó Irene que mesmo distante torce sempre pelo meu sucesso.

Alguns já partiram, mas tenho certeza que estão me guiando nessa longa caminhada.

**Amo Vocês.**

## **Ao meu querido namorado e amigo Fábio:**

A jornada pareceu árdua e difícil...

Rimos juntos, vivemos cada etapa unidos...

Amor, carinho, respeito e cumplicidade.

Sentimentos puros, verdadeiros, e intensos...

Obrigada por estar ao meu lado e fazer meus dias muito mais felizes.

**Amo Muito Você!**

## ***Agradecimentos Especiais***

---

**Ao meu orientador Prof. Eloi Dezan Júnior e Co-Orientador Elerson Gaetti Jardim Júnior:**

Exemplo de pessoas. Mais que professores, amigos para se guardar com boas lembranças.

Além da transmissão de conhecimentos aprendi também muitas coisas da vida. Cresci bastante e experiência como essa a gente jamais esquece. Tenho um orgulho imenso de ter sido orientado por educadores e pesquisadores brilhantes. Seria difícil colocar em palavras toda a admiração, confiança, carinho e respeito que tenho por vocês.

**MUITO OBRIGADO!**



À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**

Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, nas pessoas de seu Coordenador Prof. Dr. **Robson Frederico Cunha** e de todo corpo docente  
Pela contribuição na minha formação.

À **CNPq**, pela Bolsa de Mestrado.

A todos meus amigos: **Natália Pola, Carol Vital, Natália Campos, Francisco Ciesielski, Natália Manrique, Cristiane Satiko, Marli, Ana Luiza, Alex Mendez, Pâmela, Antônio Carlos Marqueti, Tatyana, Diuriane, Janaína, Paulo, Daniela, Lilian, Fabíola, Emilene, e todos aqueles que estiveram comigo nessa caminhada.** Por todos os momentos compartilhados, pelo convívio agradável, pelas sábias palavras sempre proferidas e imensurável apoio e incentivo. Sua amizade tem um valor enorme para mim, e nada que eu diga conseguiria traduzir este sentimento tão nobre. Serei eternamente grato por toda dedicação e amizade.

**MUITO OBRIGADO POR TUDO.**

Às estagiárias de Iniciação Científica e amigas **Lívia, Fernanda, Ariane e Kathlenn** pela amizade e carinho de sempre.

À Professora **Ana Cláudia** pelo carinho e atenção.

Ao querido amigo e funcionário **Robson:**

Sempre me ajudou com muita alegria. Sua bondade está presente em seu olhar! Sua ajuda foi muito importante para que este trabalho fosse realizado. Obrigado pela sua paciência, dedicação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP **Diogo e Valéria:**

**Por terem me recebido sempre tão bem, com sorriso nos lábios e um humor contagiante, independentemente de qualquer contratempo... Pela eficiência de sempre, fundamentais ao prosseguimento dos nossos trabalhos.**

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP: **Hermelinda, Neusa e Nelci.**

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP **Alexandra, Ana Cláudia, Ana Paula, Cláudia, Cláudio, Isabel, Ivone, Izamar, Luís Cláudio, Luzia e Maria Cláudia.**

**Pela eficiência, paciência e alegria com que sempre me atenderam.**

Ao Sr. **Álvaro**, e Sra. **Márcia**

**Vocês me acolheram com muito carinho, e sempre tão preocupados com meu bem-estar. O convívio com vocês tornou mais fácil estar longe de casa, pois com vocês me sinto em família e em casa. Tenho um enorme carinho por vocês. Quantos finais de semana agradáveis passei ao lado de vocês... Muito obrigado pelo amor e carinho! Amo vocês.**

A todos, **que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.**

*Epígrafe*

## *Epígrafe*

---

“Aprender é a única coisa da qual a mente humana nunca se cansa,  
nunca tem medo e jamais se arrepende”.

(Leonardo da Vinci)

*Resumo*

**SANGALLI, J. Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Associações de Extratos de Araçá (*Psidium cattleianum*) e Hidróxido de Cálcio frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* [Mestrado em Odontopediatria].** Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2010.

Extratos da folha de araçá (*Psidium cattleianum*) apresentam biocompatibilidade e atividade inibitória frente a microrganismos bucais. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de associações de extratos de araçá (*Psidium cattleianum*) associados ao hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Tubos de dentina de incisivos bovinos foram infectados *in vitro* durante 14 dias com cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 10231. A luz dos canais radiculares foi preenchida com pasta de extrato etanólico de *Psidium cattleianum* com  $\text{Ca(OH)}_2$ , extrato propilenoglicólico de *Psidium cattleianum* com  $\text{Ca(OH)}_2$  e hidróxido de cálcio com água destilada. Como controle foi empregado o soro fisiológico. Os períodos experimentais foram de 24 horas, 3, 7 e 14 dias. Após cada período realizou-se irrigação com solução salina para remoção dos medicamentos e secagem com cones de papel estéril. Brocas de diâmetros crescentes foram utilizadas para a coleta de pó de dentina. Essas amostras eram replicadas em placas ágar contendo caldo infuso de cérebro e coração (BHI), e levadas em contador digital de colônias. Para *Enterococcus faecalis* as associações de hidróxido de cálcio com extrato de araçá etanólico e propilenoglicólico apresentaram maior propriedade antimicrobiana que o hidróxido de cálcio associado à água destilada ( $p < 0,01$ ). O extrato etanólico exibiu em 24h atividade antibacteriana que o extrato propilenoglicólico e água levaram de 7 a 14 dias para atingir. Para *Candida albicans* todos os medicamentos foram efetivos em reduzir significativamente o número de unidade formadora de colônias em todos os períodos de tempo. Nas condições experimentais empregadas pode ser concluído que o extrato etanólico de *Psidium cattleianum* associado ao  $\text{Ca(OH)}_2$  foi mais rápido e efetivo contra o *E. faecalis* quando comparado ao  $\text{Ca(OH)}_2$  associado ao extrato propilenoglicólico e água destilada que necessitaram de 7 a 14 dias para exibir a mesma inibição. Todas medicações foram efetivas contra *Candida albicans*.

**Palavras-Chave:** Extratos vegetais, Hidróxido de Cálcio, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, Produtos com Ação Antimicrobiana

*Abstract*

Sangalli, J. ***In vitro* Evaluation of Antimicrobial Activity of *Psidium Cattleianum* Extracts and Calcium Hydroxide against multispecies biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*** [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2010.

Araça (*Psidium cattleianum*) extracts exhibit biocompatibility and inhibitory activity against oral microorganisms. The aim of this study was *in vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* extracts associated with calcium hydroxide  $\text{Ca(OH)}_2$  against multispecies biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Dentin tubes of extracted bovine maxillary central incisors were infected for 14 days with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* ATCC 10231. The root canals were filled with paste of ethanolic extract of *Psidium cattleianum* with  $\text{Ca(OH)}_2$ , propyleneglycolic extract of *Psidium cattleianum* with  $\text{Ca(OH)}_2$  and calcium hydroxide with distilled water. Saline was used as control. The experimental periods were 24 hours, 3, 7 and 14 days. After each period, irrigation with sterile saline to remove the medicament was performed and the canals were dried with sterile paper points. Burs of increasing diameters were used to collect dentin chips. The collected samples were replicated in agar plates with BHI, and taken into digital counter of colonies. The associations of calcium hydroxide with ethanolic extract and with propyleneglycolic extract of *Psidium cattleianum* presented higher antimicrobial property than calcium hydroxide associated with distilled water ( $p < 0.01$ ). The ethanolic extract showed the same antibacterial activity in 24 hours than that of  $\text{Ca(OH)}_2$  associated to propyleneglycolic extract or water in 7 days of activity. All drugs were effective to significantly reduce the number of CFU in all periods of time for *Candida albicans*. In the experimental conditions used it can be concluded that ethanolic extract of *Psidium cattleianum* associated with  $\text{Ca(OH)}_2$  was faster and more effective against *E. faecalis* than  $\text{Ca(OH)}_2$  associated with propyleneglycol extract or distilled water. The former needed 24 hours to demonstrate total antibacterial activity, while others needed 7 to 14 days to show the same inhibition. All drugs were effective against *Candida albicans*.

**Key Words:** Plant extracts, Calcium Hydroxide, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, Products with Antimicrobial Action



# *Lista de Figuras*

# ***LISTA DE FIGURAS***

---

Figura 1 -	Número médio de UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> em função da profundidade de dentina - Fator de variação Broca.	49
Figura 2 -	Número médio de UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> em função do tempo de medicação.	50
Figura 3 -	Número médio de UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> em função dos curativos empregados.	51
Figura 4 -	Número médio de UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> em função das associações de $\text{Ca(OH)}_2$ ao arará propilenoglicólico e etanólico.	52
Figura 5 -	Número médio de UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> em função do tempo que as medicações permaneceram no interior dos canais.	53
Figura 6 -	Número médio de UFC de <i>Candida albicans</i> em função do tempo que as medicações permaneceram no interior dos canais.	54

# *Lista de Tabelas*

# ***LISTA DE TABELAS***

---

- Tabela 1 - Número Médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em diferentes profundidades de dentina nos períodos experimentais em função dos tratamentos realizados. 47
- Tabela 2 - Número Médio de UFC de *Candida albicans* em diferentes profundidades de dentina nos períodos experimentais em função dos tratamentos realizados. 48

# *Lista de Anexos*

# ***LISTA DE ANEXOS***

---

Anexo A	Normas para Publicação segundo o Periódico “Journal of Endodontics”	53
---------	---	----

*Lista de  
Abreviaturas  
e Siglas*

# ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

---

Ca(OH) <sub>2</sub>	=	Hidróxido de cálcio
UFC	=	Unidade formadora de colônia
g	=	Grama
Fig	=	Figura
mm	=	Milímetro
h	=	Hora
BHI	=	Brain Heart Infusion
pH	=	Potencial hidrogeniônico
°C	=	Grau Celsius
µm	=	Micrometro
mL	=	Mililitro
°GL	=	Graus Gay Lussac
rpm	=	Rotações por minuto
ISO	=	International Organization for Standardization
ATCC	=	American Type Culture Collection



# *Lista de Símbolos*

# ***LISTA DE SÍMBOLOS***

---

p = Probabilidade de igualdade

% = Por cento

$\leq$  = Menor e igual

$\square$  = Menor

$\square$  = Maior

- = Menos

= = Igual

# *Sumário*

Manuscrito para Publicação	30
Página de título	31
Resumo	32
Introdução	33
Material e métodos	35
Resultados	39
Discussão	40
Referências	43
Anexos	55

*Manuscrito  
para Publicação\**

**Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Associações de Extratos de Araçá (*Psidium cattleianum*) e Hidróxido de Cálcio frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.**

Jorgiana Sangalli<sup>1</sup>, Elerson Gaetti Jardim Júnior<sup>2</sup>, Eloi Dezan Júnior<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluna de pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Brasil.

<sup>2</sup>Prof. Dr., Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Brasil.

<sup>3</sup>Prof. Dr., Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Brasil.

**Uma palavra-título (“one-word title”): Extrato de araçá /  $\text{Ca(OH)}_2$  frente a *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans***

**Palavras-Chave: Extratos vegetais, Hidróxido de Cálcio, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, Produtos com Ação Antimicrobiana**

**Autor responsável pela correspondência:**

Dr. Eloi Dezan Júnior

Rua José Bonifácio 1193, 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil.

Fone: +55-18-3636-3254 Fax: +55-18-3636-3200.

E-mail: dezan@foa.unesp.br

**Conflito de Interesse e Fonte de Apoio:**

Os autores declaram que não têm conflitos de interesse. CNPq bolsa de mestrado.

## Resumo

**Introdução:** Extratos da folha de araçá (*Psidium cattleianum*) apresentam biocompatibilidade e atividade inibitória frente a microrganismos bucais.

**Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de associações de extratos de araçá (*Psidium cattleianum*) associados ao hidróxido de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$  frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

**Material e Métodos:** Tubos de dentina de incisivos bovinos foram infectados *in vitro* durante 14 dias com cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 10231. A luz dos canais radiculares foi preenchida com pasta de extrato etanólico de *Psidium cattleianum* com  $\text{Ca(OH)}_2$ , extrato propilenoglicólico de *Psidium cattleianum* com  $\text{Ca(OH)}_2$  e hidróxido de cálcio com água destilada. Como controle foi empregado o soro fisiológico. Os períodos experimentais foram de 24 horas, 3, 7 e 14 dias. Após cada período realizou-se irrigação com solução salina para remoção dos medicamentos e secagem com cones de papel estéril. Brocas de diâmetros crescentes foram utilizadas para a coleta de pó de dentina. Essas amostras eram replicadas em placas ágar contendo caldo infuso de cérebro e coração (BHI), e levadas em contador digital de colônias.

**Resultados:** Para *Enterococcus faecalis* as associações de hidróxido de cálcio com extrato de araçá etanólico e em propilenoglicol apresentaram maior propriedade antimicrobiana que o hidróxido de cálcio associado à água destilada ( $p < 0,01$ ). O extrato etanólico exibiu em 24h atividade antibacteriana que o extrato propilenoglicólico e água levaram 7 a 14 dias para atingir. Para *Candida albicans* todos os medicamentos foram efetivos em reduzir significativamente o número de unidades formadoras de colônias em todos os períodos de tempo.

**Conclusões:** Nas condições experimentais empregadas o extrato etanólico de *Psidium cattleianum* associado ao  $\text{Ca(OH)}_2$  foi mais rápido e efetivo contra o *E. faecalis* quando comparado ao  $\text{Ca(OH)}_2$  associado ao extrato propilenoglicólico e água destilada, que necessitaram de 7 e 14 dias para exibir a mesma inibição. Todas as medicações foram efetivas contra *Candida albicans*.

## Introdução

Os microrganismos que invadem o sistema de canais radiculares e seus produtos metabólicos possuem um papel essencial no desenvolvimento das doenças pulpares e periapicais (1). O preparo biomecânico dos canais visa entre outros objetivos eliminar os microrganismos e seus produtos com a combinação da instrumentação mecânica e uso de soluções irrigadoras, que associados à etapa de curativo intracanal vêm buscar uma cadeia asséptica.

No entanto, a capacidade de proliferação e invasão de determinados microrganismos em túbulos dentinários, ramificações, deltas apicais e istmos dificulta a ação do preparo mecânico e químico (2) e pode levar ao desenvolvimento de infecções endodônticas, por vezes, refratárias ao tratamento (3).

Diferente da maioria das infecções endodônticas primárias que são polimicrobianas e com predomínio de bactérias anaeróbias obrigatórias, as infecções secundárias são compostas por uma ou poucas espécies, o que dificulta o tratamento (4). *Enterococcus faecalis*, um anaeróbio facultativo, e leveduras do gênero *Candida* desempenham um papel importante nos casos de infecções persistentes (5).

Nas infecções endodônticas, o hidróxido de cálcio,  $\text{Ca(OH)}_2$ , é amplamente utilizado como medicação intracanal, visto que possui excelentes propriedades, como a de alterar o metabolismo enzimático dos microrganismos a partir da influência de um gradiente de pH altamente alcalino e também por sua biocompatibilidade (6). Porém, o  $\text{Ca(OH)}_2$  age por contato direto e sua ação torna-se prejudicada frente a microrganismos que tem a capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários (7). Outro fator a ser considerado é o tempo de contato necessário para sua ação (8). Alguns estudos demonstram que alguns microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* ainda podem resistir a sua ação (9, 10, 11).



A utilização da clorexidina também tem recebido atenção, porém possui algumas desvantagens como sua incapacidade de dissolver matéria orgânica (12), perder sua atividade antimicrobiana quando usada por longos períodos de tempo (13) e formar uma substância tóxica a para-chloroanilina quando associada ao hipoclorito de sódio (14).

A possibilidade de emprego de outras substâncias químicas dotadas de excelentes propriedades antimicrobianas e boa tolerância biológica pode também disponibilizar condutas aplicáveis e funcionais frente a microrganismos orais refratários aos agentes químicos convencionais, especialmente aqueles que contribuem para a formação de biofilme, doenças periodontais e periapicais, sendo que, no caso das infecções endodônticas refratárias, os microrganismos se encontram profundamente posicionados no interior de túbulos dentinários e outras áreas distantes da luz do canal principal (15), dificultando o preparo biomecânico, com destaque para o papel dos enterococos, principalmente *E. faecalis*, além de leveduras, como *C. albicans* (5, 16).

O uso de plantas medicinais, cujo respaldo se dá por pesquisas etnofarmacobotânicas (17, 18, 19) tem sido explorado. Esses medicamentos fitoterápicos podem ter vantagens sobre os compostos sintéticos, tais como a diversidade, flexibilidade, acessibilidade, disponibilidade e uma ampla aceitação (20).

*Psidium* pertence à família *Myrtaceae* e é comumente encontrado na América tropical. Tradicionalmente, plantas de *Psidium spp.* são usadas para o tratamento de escorbuto na Ásia e África, para tratamento de tosse e doenças pulmonares na Bolívia e Egito, usado como anti-diarréico no México, e como antiinflamatório e agente hemostático na China (21, 22).

Recentemente estudos têm demonstrado potentes atividades antimicrobianas de extratos de *Psidium cattleianum* frente a microrganismos bucais. Estudos mostram que extratos de *Psidium cattleianum* apresentam a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos como *Streptococcus mutans* (23), anaeróbios como *Porphyromonas*

*gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, microaerófilos como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* tanto em estado planctônico quanto em biofilme (24). Atuam também na redução das expressões protéicas envolvidas com o metabolismo, glicólise e produção de ácido lático do *Streptococcus mutans* (18), e diminuem o crescimento de *Streptococcus mutans* em biofilme de ratos e a desmineralização de esmalte (25). Outro trabalho avaliou os extratos em subcutâneos de ratos para observar a resposta biológica dos tecidos e estes se mostraram biocompatíveis, estimulando ainda mais seu possível uso (26). No entanto, esses extratos ainda não foram estudados frente a biofilmes multiespécies de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em canalículos dentinários.

Tendo em vista as propriedades antimicrobianas dos extratos de *Psidium cattleianum*, foi proposta a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de associações de extratos de arazá (*Psidium cattleianum*) etanólico e em propilenoglicol e hidróxido de cálcio frente a biofilme multiespécie de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo dos extratos vegetais

Folhas de *Psidium cattleianum* foram coletadas na região do município de Carolina (MA), Brasil, em áreas não desmatadas, nas propriedades rurais e em condições naturais, sem adição de compostos químicos, como fertilizantes químicos, pesticidas e inseticidas. As folhas foram coletadas em janeiro de 2005 e identificadas pelas características morfológicas por botânico e depositadas no Herbário e Laboratório de Pesquisa Fitoterápica, Centro Universitário de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, sob o número de HLF 2006/71.

As folhas foram lavadas três vezes em água deionizada e colocadas para secar ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (média de 27°C), por 5 dias, e a 37°C por 15 dias até se tornarem quebradiças. A seguir, realizou-se a etapa de fragmentação das folhas em

liquificador industrial até obtenção de fragmentos grosseiros. Para a homogeneização dos fragmentos foram utilizados tamises de 150 e 75 µm. Para a extração dos extratos etanólicos de araquê foram pesados 5 gramas da droga (folhas moídas) e armazenadas num cartucho de papel filtro que foi lacrado e acondicionado em extrator de Soxhlet. A extração foi realizada com 150 mL de álcool etílico 96°GL. O sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 4 horas. A seguir, após alcançar temperatura ambiente, o extrato foi retirado do equipamento e acondicionado em frasco de vidro âmbar. Para a obtenção dos extratos em propilenoglicol, 5 gramas da droga foram acomodadas em percolador e submetidos ao processo de lixiviação com 150 mL de propilenoglicol. Em seguida os dois extratos obtidos foram esterilizados utilizando uma membrana celulose de 0,22 µm (Millipore <sup>TM</sup>, Billerica, USA).

### **Preparo dos blocos de dentina**

Utilizou-se o método descrito por Haapasalo e Orstavik (27). Nos ensaios, incisivos bovinos, com formação completa da raiz, foram selecionados para o estudo.

O ápice dental e a coroa foram removidos com um disco diamantado montado em torno. Os blocos cilíndricos com aproximadamente 4 mm de altura tiveram a luz do canal padronizada com brocas de aço esféricas com diâmetro de 1,8 mm (ISO 018, Maillefer Dentsply, Ballaigues, Switzerland). Durante todos os procedimentos os espécimes foram mantidos em água destilada para evitar a desidratação. Após o preparo da luz do canal, a *smear layer* foi removida com EDTA 17% por 10 minutos em cuba ultrassônica, logo depois os espécimes foram submetidos por 15 minutos a banho com água destilada e então, lavados por 1 hora em água corrente. Os blocos de dentina foram autoclavados por 15 minutos a 121°C.

Previamente à contaminação dos canais, os espécimes de dentina foram secos e revestidos externamente com esmalte de unhas.

## Contaminação dos blocos

Inicialmente os espécimes foram incubados a 37°C em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo infuso de cérebro coração (BHI) (Difco, Detroit, USA) acrescido de extrato de levedura (0,5%) e glicose (1%) por 24 horas para controle de esterilidade.

Foram utilizados os microrganismos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 10231. O inóculo microbiano consistiu de 10<sup>6</sup> UFC de *Enterococcus faecalis* obtido por espectrofotometria. Esse meio de cultura foi substituído diariamente por 7 dias para a formação de biofilme microbiano no interior dos túbulos dentinários. No 8º dia adicionou-se igual inóculo de *Candida albicans* para a formação de biofilme multiespécie, que foi mantida nas mesmas condições descritas acima.

Nas trocas diárias do meio de cultura, realizava-se a avaliação da contaminação microbiana exógena, em culturas diárias do material retirado dos tubos em ágar BHI acrescido de extrato de levedura, mantido a 37°C, por 24-48 h, em microaerofilia, em dessecadores de vidro do tipo Pyrex. As colônias resultantes eram submetidas à avaliação morfocolonial e morfocelular (coloração de Gram) para confirmar a existência de uma cultura mista constituída apenas de cocos e leveduras.

## Medicação

Os espécimes foram divididos de acordo com a medicação intracanal utilizada, como segue:

- Ca(OH)<sub>2</sub> associado à água destilada - 16 espécimes.
- Ca(OH)<sub>2</sub> associado ao extrato etanólico de araquê - 16 espécimes.
- Ca(OH)<sub>2</sub> associado ao extrato de araquê propilenoglicólico - 16 espécimes.
- Controle - Soro fisiológico 0,85% - 8 espécimes.

Para aparar os espécimes de dentina placas de petri foram preenchidas com 5 mL de ágar-ágar a 3,5% e o restante da placa com ágar BHI. Os poços para colocação dos espécimes foram feitos com recortadores de ágar estéreis. No preparo das associações, os extratos foram

acrescidos de hidróxido de cálcio em uma proporção de 1g / 1mL e levados para preencher toda luz do canal com auxílio de seringas e agulhas. Em seguida, com cera pegajosa estéril selou-se a entrada do canal para manter a umidade do material.

Os espécimes foram incubados a 37°C em microaerofilia, pela técnica da chama de vela, em dessecadores de vidro. Os períodos experimentais foram 24 horas, 3, 7 e 14 dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### **Amostras de dentina**

Ao final de cada período experimental, os espécimes foram removidos da cultura e sua parte externa desinfetada com álcool 70%. O canal foi irrigado com 5,0 mL de solução salina estéril para remoção de toda medicação presente, a seguir, o canal foi seco com cones de papel absorvente.

Utilizando-se um porta agulha Mayo Hegar estéril, o espécime foi segurado sobre as bordas de um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução fisiológica. Brocas de diâmetro crescentes (ISO 021, 023, 025 e 0,27) com velocidade de 300 rpm, proporcionada por motor endodôntico, foram usadas para remover a dentina em profundidade.

A primeira broca removeu em profundidade 300 µm e as subseqüentes 200 µm. O tubo de ensaio contendo as raspas de dentina e soro fisiológico foi agitado em vórtex, por 30s, e submetido a diluições seriadas, onde 0,1 mL da solução foi transferida para outro tubo de ensaio contendo 0,9 mL de solução fisiológica e assim sucessivamente até a diluição de  $10^{-3}$ . Em seguida 0,1 mL da solução foi replicada em placas BHI e essas foram levadas para estufa por um período de 48 horas para posterior contagem de colônias.

Para a contagem de colônias no grupo controle foi utilizado a placa de diluição  $10^{-3}$ , nos demais grupos utilizou-se a placa sem diluição. As contagens consideraram o número total de colônias detectadas, bem como os valores relativos à contaminação por *E. faecalis* e *C. albicans*, analisadas em conjunto e separadamente.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC)/0,1 mL. As comparações entre os fatores de variação tempo, broca e curativo foram realizadas pela análise de variância, seguidas pelo Teste de Tukey. Os valores foram considerados significantes quando a diferença atingiu pelo menos 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

O grupo controle (solução fisiológica 0,85%) não apresentou qualquer atividade antimicrobiana, exibindo grande quantidade de microrganismos viáveis em todos os períodos experimentais. Todas as associações de  $\text{Ca(OH)}_2$  utilizadas apresentaram atividade antimicrobiana. As tabelas 1 e 2 mostram o número médio de unidades formadoras de colônia das amostras após tratamento em diferentes profundidades, relativas ao diâmetro das brocas utilizadas no desgaste da dentina (ISO 021, 023, 025, 027) em 4 intervalos de tempos de permanência dos curativos (24 horas, 3, 7 e 14 dias) para o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* respectivamente.

A profundidade da dentina coletada não apresentou diferença significativa quanto ao número de UFC para *Enterococcus faecalis*,  $p > 0,05$  (Fig. 1), sem considerar o fator tempo e os curativos utilizados.

O fator tempo quando avaliado isoladamente foi significativo ( $p = 0,0001\%$ ), mostrou maior redução dos microrganismos nos períodos de 7 e 14 dias (Fig. 2).

A associação de hidróxido de cálcio com extrato de araquê etanólico e propilenoglicólico apresentaram atividade antimicrobiana mais eficiente que o hidróxido de cálcio em água destilada ( $p = 0,0002\%$ ), como pode ser observado na figura 3.

Avaliando apenas as duas associações dos extratos, observou-se que o araquê etanólico apresentou atividade antimicrobiana significativamente superior ao extrato propilenoglicólico ( $p = 0,0212\%$ ), figura 4.

Quando avaliado a relação tempo e curativo tivemos uma diferença significativa na redução dos números médios de unidades formadoras de colônia ( $p=0,0004\%$ ). A associação de hidróxido de cálcio ao extrato de araquá etanólico apresentou em 24 horas uma atividade antimicrobiana que as associações de hidróxido de cálcio à água destilada e extrato de araquá propilenoglicólico demoraram 7 e 14 dias para atingir (Fig. 5).

No período de 24h a associação de hidróxido de cálcio ao extrato de araquá propilenoglicólico produziu maior atividade antimicrobiana que a associação de hidróxido de cálcio à água destilada ( $p<0,05$ ), sendo ambas inferiores a associação de hidróxido de cálcio ao extrato de araquá etanólico. Nos períodos de 7 e 14 dias todas associações comportaram-se de forma semelhante (Fig 5).

Para *Candida albicans* todos os medicamentos foram efetivos em reduzir significativamente o número de unidade formadora de colônias em todos os períodos de tempo (Tab. 2, Fig. 6).

## DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para infecção dos canalículos dentinários foi descrita por Haapasalo e Orstavik (27), que permite o desenvolvimento de biofilme em profundidade no sistema de canais radiculares, de forma semelhante ao observado em infecções endodônticas.

*Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* foram escolhidos como microrganismos teste, pois têm sido envolvidos em infecções persistentes e de resistência a ação do hidróxido de cálcio (9, 10, 11). Em estudo piloto observou-se que a associação de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* formou grande quantidade de biofilme.

O grupo controle (solução fisiológica 0,85%) apresentou um número elevado de unidades formadoras de colônia em todos os períodos de tempo e em diferentes profundidades, comprovando que a metodologia permitiu a contaminação dos canalículos dentinários.

A metodologia para obtenção dos extratos etanólicos e propilenoglicólico de araçá foi efetiva na extração dos princípios ativos, já que estes apresentaram atividade antimicrobiana.

Foram recuperadas bactérias em todas as profundidades de dentina. Embora não haja significância, com 900 µm (ISO 027) houve uma maior tendência de quantidade de unidades formadoras de colônias, fato já esperado em função da distância da luz do canal que contém a medicação.

Dentre as medicações empregadas como curativo de demora, o hidróxido de cálcio apresenta biocompatibilidade e atividade antimicrobiana (6), mas como todo produto químico, precisa de um tempo de contato para sua ação ocorrer, que, no caso desse álcali, contra o *E. faecalis*, é de aproximadamente 14 dias (8, 9, 28).

Ambos extratos apresentaram maior atividade bactericida em 24h que a água destilada, quando associados ao hidróxido de cálcio. O extrato de araçá etanólico superou a atividade apresentada pelo propilenoglicólico, reduzindo o tempo necessário para a atividade bactericida máxima para 24 horas frente a *E. faecalis*, considerado tolerante a alcalinidade (29) e freqüente em infecções refratárias ou de retratamento endodôntico (3).

O melhor resultado apresentado pelos extratos no período de 24h provavelmente relaciona-se ao fato do *P. cattleianum* conter flavonóides (kaempferol, quercetina e cianidina) e taninos (ácido elágico), que são reconhecidos pela atividade antibacteriana (30). Os flavonóides são metabólitos secundários naturalmente sintetizados por plantas como uma reação à infecção microbiana (31). Sua atividade é provavelmente devido a sua capacidade de formar complexos com proteínas extracelulares (32). E os taninos são ativos contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias (33).

Uma possível explicação para a mais rápida ação antimicrobiana do extrato etanólico é que esta forma de extração possa apresentar maior quantidade de princípios ativos. Outra explicação pode estar relacionada às propriedades físicas do propilenoglicol, mais viscoso e



com maior tensão superficial que o etanol, podendo ser mais lento na penetração dos túbulos dentinários.

Frente a *Candida albicans*, todas as associações, incluindo o hidróxido de cálcio associado à água destilada foram efetivos em reduzir significativamente o número de unidades formadoras de colônias em todos os períodos de tempo, discordando dos resultados de Waltimo et al. (10), que embora obtidos com uma metodologia diferente mostrou a resistência da *Candida albicans* até mesmo em contato direto com o hidróxido de cálcio. A efetividade das associações se apresentou elevada em todos os períodos de tempo possivelmente em função da menor tolerância à inibição enzimática que esse fungo apresenta, além do fato de que, em comparação com os enterococos, tais leveduras se posicionam mais superficialmente no interior do biofilme e do sistema de canais radiculares (15).

Assim, com a potente atividade antimicrobiana das associações de extratos de araquê e hidróxido de cálcio apresentadas, tais extratos apresentam-se promissores para a utilização clínica. Novos trabalhos ainda se fazem necessários para a avaliação de suas propriedades biológicas.

## CONCLUSÕES

A associação dos extratos de araquê ao hidróxido de cálcio apresentou resultados superiores quando comparado à água destilada e hidróxido de cálcio.

O extrato etanólico associado ao hidróxido de cálcio já apresenta atividade antimicrobiana máxima frente a biofilme multiespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* em um período de 24 horas.

## 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; 20:340-9.
2. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89:321-8.
3. Safavi KE, Spangberg SW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 1990; 16:207-10.
4. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:443-9.
5. Ercan E, Dalli M, Dülgergil 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; 102:27-31.
6. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe-Jr O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995; 6:85-90.
7. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-9.
8. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24:119-25.
9. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:142-9.

10. Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999; 32:421-9.
11. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221-8.
12. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004; 37:38-41.
13. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003; 36:267-75.
14. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod* 2007; 33:966-69.
15. Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro yeast Infection Dentin. *J Endod* 2000; 26:207-9.
16. Roças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms or periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30:315-20.
17. Gentil M, Pereira JV, Sousa YTCS, Pietro R, Souza Neto MD, Vansan LP, et al. *In Vitro* Evaluation of the Antibacterial Activity of *Arctium lappa* as a Phytotherapeutic Agent used in Intracanal Dressings. *Phytother Res* 2006; 20:184-186.
18. Brighenti FL, Luppens SBI, Delbem ACB, Deng DM, Hoogenkamp MA, Gaetti-Jardim Jr. E, et. al.. Effect of *Psidium cattleianum* Leaf Extract on *Streptococcus mutans* Viability, Protein Expression and Acid Production. *Caries Res* 2008; 42: 148-154.

19. Groppo FC, Bergamaschi C de C, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RH, Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res* 2008; 22:993-8.
20. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005, Geneva: WHO; 2002.
21. Lozoya X, Meckes M, Aboud- Zaid M, Tortoriello J, Nozzolillo C, Amason JT. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of spasmolytic principle. *Arch Med Res* 1994; 25:11-15.
22. Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, Peungvicha P, Suriyawong P, Saraya ML, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:203-212.
23. Salineiro FCS, Bianco KG, Gaetti Jardim-Júnior E. Evaluation of antimicrobial activity of plant extracts from the Brazilian savannah on *Streptococcus mutans*. *J Appl Oral Sci* 2009; n. esp.: 485 Abstract 307.
24. Sangalli J, Dezan Jr E, Gaetti-Jardim Jr. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian savanna on microbial biofilms [abstract]. *Braz Oral Res* 2009; 23(Suplemento 1):294.
25. Menezes TEC de, Delbem ACB, Brighenti FL, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr E. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. *Pharmaceutical Biology* [serial online] 2010; 48:300-305.
26. Ruvière DB, Machado AC, Novais RZ, Gaetti Jardim-Junior E, Dezan Jr E. Evaluation of the tissue response to inactivated microorganisms associated with aqueous and hydroalcoholic araçá (*Psidium cattleianum*) solutions. *J Appl Oral Sci* 2009; n. esp.: 432 Abstract 019.

27. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66:1375-9.
28. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 1993; 19:302-306.
29. 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; 1:170-5.
30. National Genetic Resources Program, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. 15 May 2005.
31. Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1983; 55:1-136.
32. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:564-582.
33. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30:3875-83.

**Tabela 1.** Número Médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em diferentes profundidades de dentina nos períodos experimentais em função dos tratamentos realizados.

Tratamento	Tempo (dias)	Profundidades de dentina (broca)			
		300µm (021)	500µm (023)	700µm (025)	900µm (027)
HC + Água destilada	1	62,7	102,7	68	218
	3	159,2	31,7	44,2	11,2
	7	5,7	7,5	2	1,7
	14	4,5	6,7	3,7	2,7
HC + EEA	1	0	0,5	0,5	2,7
	3	0	0	1,7	5
	7	1,5	0	0,7	2,
	14	0	0	0	0
HC + EPA	1	1,7	50,2	19,2	29,
	3	20,2	35	36,5	79
	7	0	0	1,5	2,5
	14	0,5	0	1	0
Controle	1	333000	32500	12500	46500
	3	326000	85500	14000	54000
	7	100500	19000	12000	26500
	14	84500	19000	10500	29500

UFC- Unidades formadoras de colônia

HC- Hidróxido de Cálcio

EEA- Extrato etanólico de araçá

EPA- Extrato propilenoglicólico de araçá

**Tabela 2.** Número Médio de UFC de *Candida albicans* em diferentes profundidades de dentina nos períodos experimentais em função dos tratamentos realizados.

Tratamento	Tempo (dias)	Profundidades de dentina (broca)			
		300µm (021)	500µm (023)	700µm (025)	900µm (027)
HC + Água destilada	1	0	0,2	0	0
	3	0	0	0	0
	7	3,2	0	0,25	0,2
	14	1,75	0,25	0	0
HC + EEA	1	0	0,5	0,5	2,7
	3	0	0	0	5
	7	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
HC + EPA	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	7	1	0	0	0
	14	0	0	0	0
Controle	1	7000	1500	1000	1000
	3	21500	9000	1000	1000
	7	2500	4000	1000	4000
	14	7000	1500	1000	1500

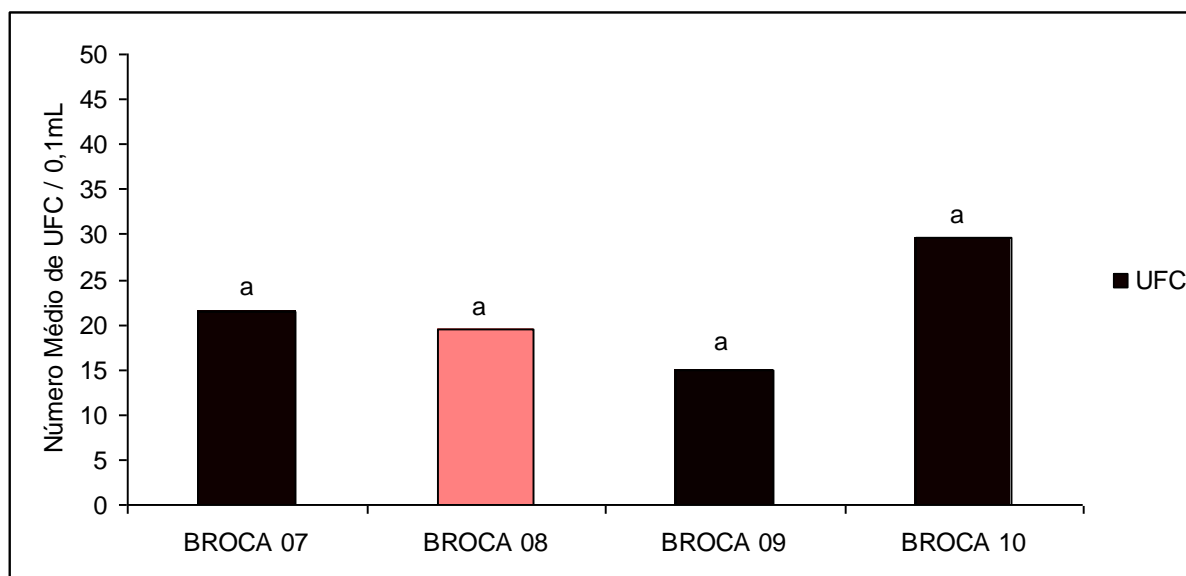
UFC- Unidades formadoras de colônia

HC- Hidróxido de Cálcio

EEA- Extrato etanólico de araçá

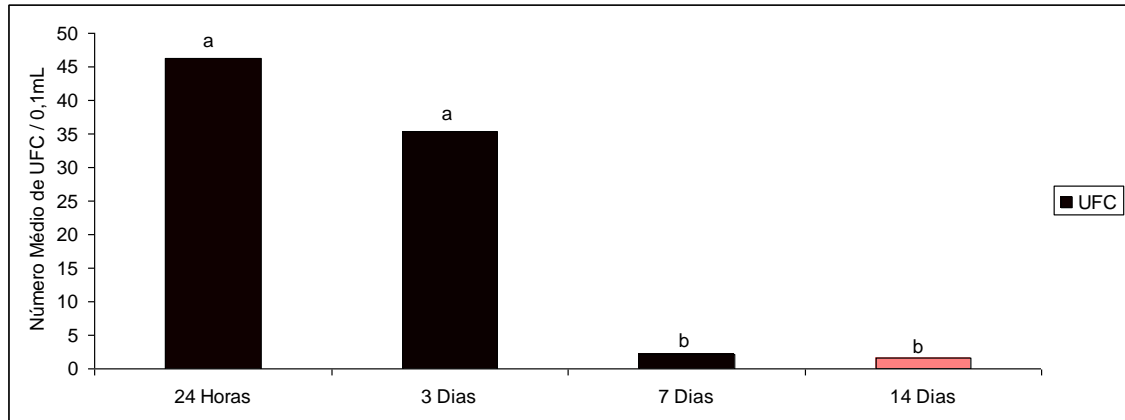
EPA- Extrato propilenoglicólico de araçá

**Figura 1.** Número médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em função da profundidade de dentina - Fator de variação Broca.

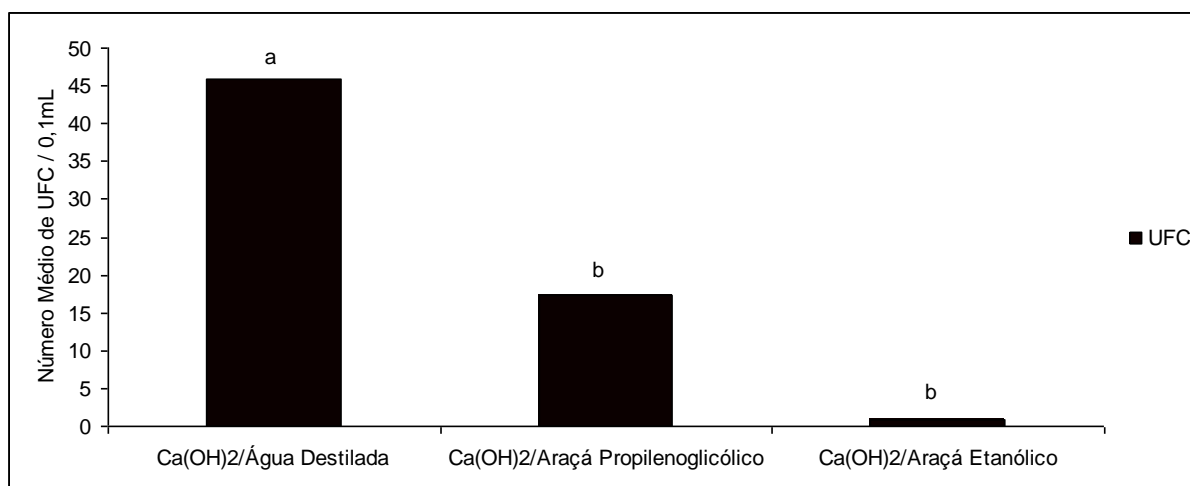




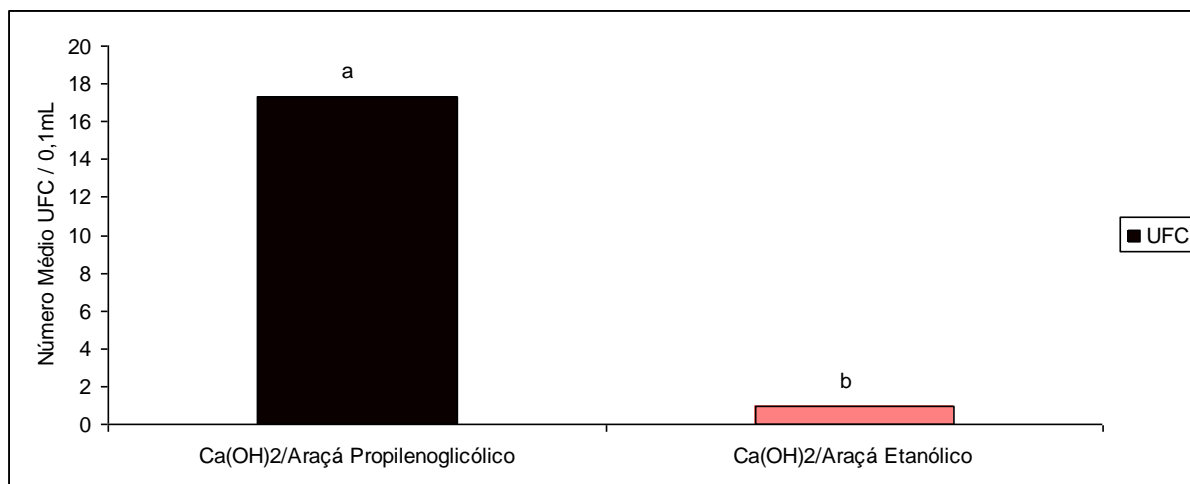
**Figura 2.** Número médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em função do tempo de medicação.



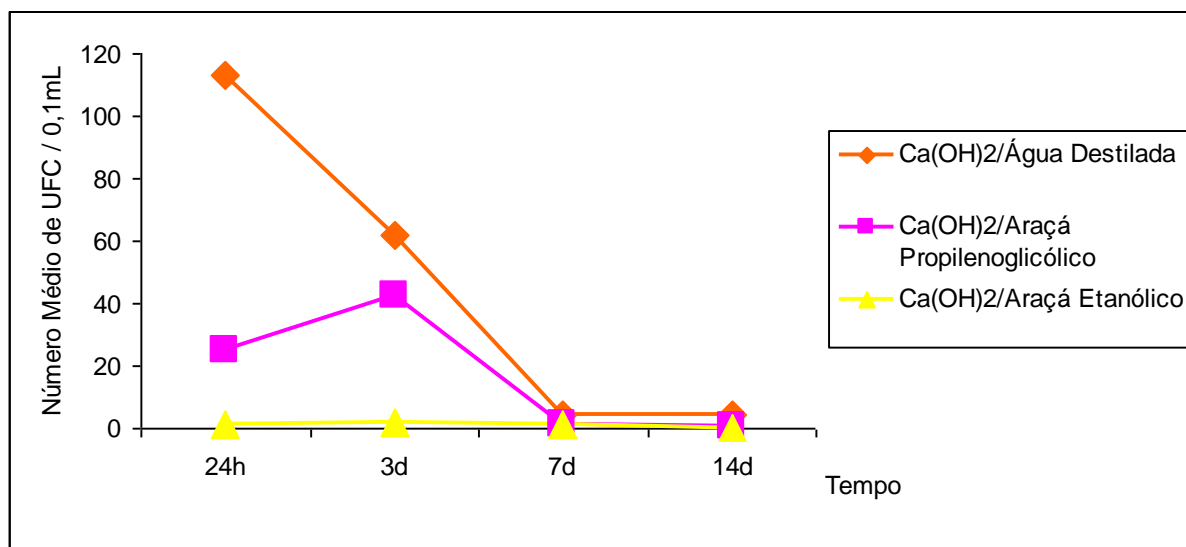
**Figura 3.** Número médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em função dos curativos empregados.



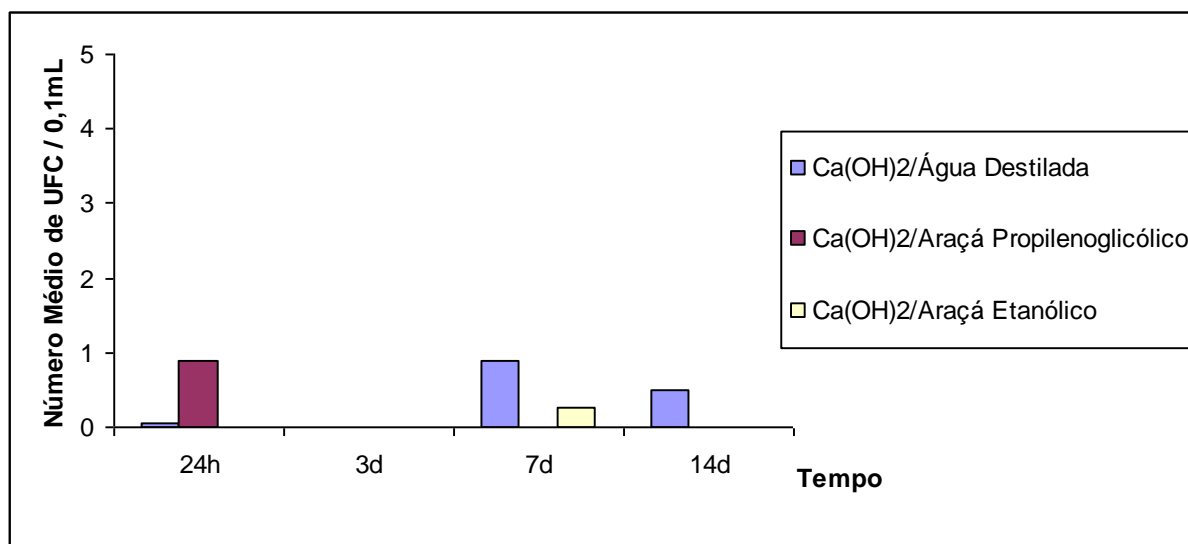
**Figura 4.** Número médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em função das associações de  $\text{Ca(OH)}_2$  ao aração propilenoglicólico e etanólico .



**Figura 5.** Número médio de UFC de *Enterococcus faecalis* em função do tempo que as medicações permaneceram no interior dos canais.



**Figura 6.** Número médio de UFC de *Candida albicans* em função do tempo que as medicações permaneceram no interior dos canais.



*Anexos*

## *Anexo A – Normas para Publicação segundo o Periódico “Journal of Endodontics”*

---



The *Journal of Endodontics*, the official journal of the American Association of Endodontists, publishes scientific articles, case reports and comparison studies evaluating materials and methods of pulp conservation and endodontic treatment. Endodontists and general dentists can learn about new concepts in root canal treatment and the latest advances in techniques and instrumentation in the one journal that helps them keep pace with rapid changes in this field.

The *Journal of Endodontics* is ranked 7th of 55 Dentistry, Oral Surgery & Medicine category on the 2009 Journal Citation Reports®, published by Thomson Reuters, and has an Impact Factor of 2.727.

### **Guide for Authors**

The *Journal of Endodontics* is owned by the American Association of Endodontists. Submitted manuscripts must pertain to endodontics and may be original research (e.g., clinical trials, basic science related to the biological aspects of endodontics, basic science related to endodontic techniques, case reports or zebras) or review articles related to the scientific or applied aspects of endodontics. Authors of potential review articles are encouraged to first contact the editor during their preliminary development via e-mail at [JEndodontics@UTHSCSA.edu](mailto:JEndodontics@UTHSCSA.edu)). Manuscripts submitted for publication must be submitted solely to the *JOE* and not published elsewhere.

### **First-Time Users**

All manuscripts must be submitted online through the Elsevier Editorial System at <http://ees.elsevier.com/joe/>. Please click the Register button on the home page and enter the requested information. Upon successful registration, you will be sent an e-mail indicating your username and password. Print a copy of this information for future reference. (Note: If you have received an e-mail from us with an assigned username and password, or if you are a repeat user, do not register again; just log in. Once you have an assigned username and password, you do not have to reregister, even if your status changes (that is, author, reviewer or editor).)

**Authors:** Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log in to the system as an Author. Submit your manuscript according to the contributor instructions. You will be able to track the progress of your manuscript during the review. If you experience any problems, please contact Ken Hargreaves, D.D.S., Ph.D., at [JEndodontics@UTHSCSA.edu](mailto:JEndodontics@UTHSCSA.edu) or by fax at 210/567-3389. Requests for help and other questions will be addressed in the order received.

### **Submission of Manuscript**

Please review the [guidelines for publishing papers in the \*JOE\*](#) before submitting your manuscript.

A cover letter, containing signatures of all authors and the following information, must be scanned and submitted on the Web site with the manuscript files or else mailed to Kenneth Hargreaves, D.D.S., Ph.D., Editor, Dept. of Endodontics, UTHSCSA, 7703 Floyd Curl Dr, San Antonio, TX 78229-3900:

- a. The manuscript title, name and address (including e-mail) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable.
- b. The following paragraph: “In consideration of the editors of the *Journal of Endodontics* taking action in reviewing and editing this submission, the author(s) undersigned hereby transfer, assign or otherwise convey all copyright ownership to the AAE in the event that such work is published in that Journal.”
- c. If the purpose of a paper is to evaluate a commercial product, then a separate statement must be included with the submission, which asserts that the product was used exactly according to manufacturer’s instructions. If this was not the case, a precise description of any variant use must be prominently stated in the abstract, methods and, if appropriate, in the title.
- d. All authors must also sign the following statement, which must accompany the manuscript: “I affirm that I have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest is disclosed.” Any author who cannot sign this statement must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. This paragraph should follow the “Discussion” section.
- e. If human subjects are used, include the following statement: “The informed consent of all human subjects who participated in the experimental investigation reported or described in this manuscript was obtained after the nature of the procedure and possible discomforts and risks had been fully explained.”
- f. If animals are used, a statement on protocol approval by the institutional animal care and use committee must be included.

### **Disclaimer**

“The statements, opinions and advertisements in the *Journal of Endodontics* are solely those of the individual authors, contributors, editors or advertisers, as indicated. Those statements, opinions and advertisements do not effect any endorsement by the American Association of Endodontists or its agents, authors, contributors, editors or advertisers, or the publisher. Unless otherwise specified, the American Association of Endodontists and the publisher disclaim any and all responsibility or liability for such material.”

### **Guidelines for Publishing Papers in the JOE**

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.



1. The JOE publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the JOE has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

## 2. General Points on Composition

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the JOE:

a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c”, below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)”. In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

c. Sentences are stronger when written in the active voice, i.e., the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation”, can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation”. Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, Endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method”, can be edited to “Formerly, Endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation”. The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used”, can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study”.

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

### **General Points on the Organization of Original Research Manuscripts**

**Please Note:** *Starting in 2009, all abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*

**Title Page:** The title should describe the major conclusion of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

**Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to provide sufficient detail. However, many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals.

**Material and Methods:** The objective of the methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The three components to this section are the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast

majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the particular aspects used in the present study. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript should state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. Studies on humans should conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB approved the protocol and that informed consent was obtained. Studies involving animals should state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis, drop-outs from clinical trials, etc.

**Results:** Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study. Do not include all available data without justification, any repetitive findings will be rejected from publication. All Figs./Charts/Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

**Figures:** There are two general types of figures. The first type of figure includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing on your part given the small size of each panel, you will only be able to illustrate the most important feature of each photomicrograph. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., “A”, “B”, etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Chang, et al, (*JOE* 28:90, 2002), Hayashi, et al, (*JOE* 28:120, 2002) and by Davis, et al (*JOE* 28:464, 2002). At the Editor’s discretion, color figures may be published at no cost to the authors. However, the Editor is limited by a yearly allowance and this offer does not include printing of reprints.

The second type of figure are graphs (i.e., line drawings) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

**Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

**Discussion:** The conclusion section should describe the major findings of the study. Both the strength and weaknesses of the observations should be discussed. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions? How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion.

**References:** The reference style follows Index Medicus and can be efficiently learned from reading past issues of the *JOE*. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

#### **4. Page Limitations for Manuscripts in the Category of Basic Science/Endodontic Techniques**

**What is the limitation?** Original research reports in the category of basic science/endodontic techniques are limited to no more than 2,000 words (total for the abstract, introduction, methods, results and conclusions), and a total of three Figs./Charts/Tables. If a composite figure is used (as described above), then this will count as two of the three permitted Figs./Charts/Tables.

**Does this apply to me?** Manuscripts submitted to the *JOE* can be broadly divided into several categories including review articles, clinical trials (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies), basic science/biology (animal or culture studies on biological research related to endodontics, or relevant pathology or physiology), and basic science/techniques (e.g., stress/strain/compression/strength/failure/composition studies on endodontic instruments or materials). Manuscripts submitted in this last category are the only category subject to these limitations. If you are not sure whether your manuscript falls within this category please contact the Editor by e-mail at [jendodontics@uthscsa.edu](mailto:jendodontics@uthscsa.edu).

**Why page limitations?** Most surveyed stakeholders of the *JOE* desire timely publication of submitted manuscripts and an extension of papers to include review articles and other features. To accomplish these goals, we must reduce the average length of manuscripts since increasing the *JOE*'s number of published pages is prohibitively expensive. Although a difficult decision, restricting this one category of manuscripts accomplishes nearly all of these goals since ~40-50% of published papers are in this category.

**How do I make my manuscript fit these limitations?** Adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor will reject manuscripts that exceed these limitations.

### **Available Resources:**

- a. Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X
- b. Day R.. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9
- c. Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar)
- d. Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
- e. Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.