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

-

CAROLINE TREFIGLIO ROCHA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANAS DOS EFEITOS COMBINADOS E ANTIBIOFILME DOS EXTRATOS DE *Cinnamomum verum* E *Psidium guajava* COMO SOLUÇÕES IRRIGADORAS SOBRE BIOFILME ENDODONTICO EM CANAIS RADICULARES [*in vitro* e modelo *ex* vivo]

2025

CAROLINE TREFIGLIO ROCHA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANAS DOS EFEITOS COMBINADOS E ANTIBIOFILME DOS EXTRATOS DE *Cinnamomum verum* E *Psidium guajava* COMO SOLUÇÕES IRRIGADORAS SOBRE BIOFILME ENDODONTICO EM CANAIS RADICULARES [*in vitro* e modelo *ex* vivo]

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 DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Prof. Tit. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Amjad Abu Hasna

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. 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).

Rocha, Caroline Trefiglio
Avaliação da atividade antimicrobiana dos efeitos combinados e antibiofilme dos extratos de Cinnamomum verum e Psidium guajava como soluções irrigadoras sobre biofilme endodôntico em canais radiculares [in vitro e modelo ex vivo] / Caroline Trefiglio Rocha. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.
80 f. : il.

Tese (doutorado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.
Orientador: Claudio Antonio Talge Carvalho
Coorientador: Amjad Abu Hasna

1. Enterococcus faecalis. 2. Periodontite apical. 3. Cinnamomum verum . 4. Psidium guajava. 5. Endodontia. I. Carvalho, Claudio Antonio Talge, orient. II. Hasna, Amjad Abu, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. V. Universidade Estadual Paulista (UNESP). VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Profa. Leila Novaes e Diretoria Técnica de Informática - ICT/UNESP.
Renata Aparecida Couto Martins CRB-8/8376

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este estudo tem o potencial de oferecer alternativas inovadoras para o tratamento de infecções endodônticas através de extratos fitoterápicos. A abordagem pode desempenhar um papel na redução de microrganismos resistentes, uma preocupação global crescente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) solicita urgência na descoberta de novos antimicrobianos. A pesquisa também abre portas para a compreensão mais profunda das interações sinérgicas entre compostos naturais, estimulando o interesse em fitoterapia e ressaltando a complexidade e potencial terapêutico das substâncias derivadas de plantas. O impacto social e econômico, se dá através da descoberta de propriedades biológicas das substâncias de origem vegetal que são encontradas em abundância no mundo diminuindo os custos das indústrias farmacêuticas. Assim, o trabalho contribui tanto para a constante evolução do combate as infecções endodônticas como a possibilidade de uma trajetória para outras pesquisas de agentes antimicrobianos naturais e suas diversas aplicações na área da saúde.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study holds the potential to provide innovative alternatives for the management of endodontic infections through the use of herbal extracts. Such an approach may contribute to the reduction of resistant microorganisms, a growing global concern, The World Health Organization (WHO) emphasizes the urgent need for the discovery of new antimicrobials. Furthermore, this research fosters a deeper understanding of the synergistic interactions among natural compounds, thereby stimulating scientific interest in phytotherapy and underscoring both the complexity and therapeutic potential of plant-derived substances. The social and economic impact lies in the identification of biological properties of plant-based resources, which are abundantly available worldwide and may reduce costs within the pharmaceutical industry. In this context, the present study contributes not only to the continuous advancement in the management of endodontic infections but also to the development of new perspectives for the investigation of natural antimicrobial agents and their broad applications in healthcare.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Claudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos- SP

Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos - SP

Profa. Vanessa Marques Meccatti Domiciano
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos - SP

Prof. Dr. Felipe de Souza Matos
Universidade Federal de Campina Grande
Campina Grande – PB

Profa. Dra. Lillian Eiko Maekawa
Universidade de Mogi das Cruzes
Mogi das Cruzes – SP
São José dos Campos, 10 de outubro de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu marido, **Rafael Matoba de Souza Leme**, por ser meu porto seguro, meu companheiro de caminhada e por me presentear com o maior amor da vida: nosso filho **João Francisco** (ainda no forninho). E dedico esta tese ao meu menininho, que me mostrou ser possível construir, lado a lado, uma vida acadêmica e uma vida pessoal, eu amo vocês!

Aos meus pais, **João Carlos e Eliana**, os quais eu jamais teria chegado até aqui. Este título é fruto do amor, da dedicação e de tudo o que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Giuliana, Thiago e Raphael, pelo companheirismo e por estarem presentes em todas as etapas da minha vida.

À Nossa Senhora, que nunca me desamparou e sempre esteve à frente de todos os meus passos.

AGRADECIMENTOS

*À **Deus e Nossa Senhora,** que sempre estiveram à frente dos meus passos e colocaram pessoas incríveis ao longo desses quase 10 anos de UNESP, permitindo-me crescer a cada dia.*

*Ao meu marido, **Rafael Matoba**, a pessoa mais extraordinária que conheço. Agradeço pela paciência, pelo amor, pelas risadas, pelo companheirismo, pela positividade e por todos os nossos dias., você deixa a vida mais leve. Você torna a vida mais leve, vibrou com cada conquista e nunca me deixou desistir dos meus sonhos, grandes ou pequenos. Somos mais fortes porque estamos juntos. Te admiro demais. Eu te amo mais que tudo nessa vida!!!!!!*

*Aos meus pais, **João Carlos e Eliana Trefiglio**, pela educação que me proporcionaram e pelo amor incondicional em todas as etapas da minha vida. Vocês sempre vibraram com cada conquista, sustentando-me com apoio, dedicação e exemplo. Sou eternamente grata a tudo que fizeram por mim. Este título só foi possível graças a todo o suporte nos bastidores, minha base, minha inspiração. Amo vocês!*

*Aos meus irmãos, **Giuliana, Thiago e Raphael** por estarem sempre presentes e pela nossa amizade acima de tudo. Apenas quem ter irmãos sabe o que é nunca estar sozinho. Dividir a vida com vocês é incrível e um privilégio. Tenho os melhores irmãos do mundo, amo você!*

*Aos meus cunhados, **Guilherme, Ana e Gabriela** por dividirem momentos importantes e por torcerem por mim. Às preciosidades da nossa família, **Theo e Catarina,** que tornaram os últimos 2 anos mais felizes.*

*Aos meus sogros, **Bianca e Ulisses**, por compreenderem as inumeras vezes que não pude estar presente em eventos por causa de especialização, do mestrado ou do doutorado, e por sempre nos receberem tão bem. Tenho certeza de que eu tenho os melhores sogros! Aos meus cunhados, **Lucas, André, Thaina e Carolina** pelo carinho e amizade.*

*Aos professores da UNESP da disciplina de Endodontia: à **Profa. Tit Marcia Carneiro Valera** pela torcida, pelo carinho e por aceitar novamente compor a minha banca. Tenho uma admiração enorme pela senhora. À **Prof. Assoc. Ana Paula***

Martins Gomes *por todas as conversas e por ser tão amorosa comigo, brinco que o bichinho da endodontia me picou quando fui a clínica com a senhora ainda na graduação, tenho um carinho enorme. À* ***profa. Dra. Rayana Duarte Khoury*** *pela amizade, pela troca de experiencia, foi uma alegria acompanhar algumas de suas conquistas. Ao* ***prof. Dr. Amjad Abu Hasna****, meu coorientador, pela amizade, pelas conversas, pela visão de vida tanto profissional como pessoal e principalmente pela ajuda independente do que fosse necessário, tenho um enorme carinho por você.*

Ao meu orientador, ***Prof. Tit. Claudio Antonio Talge Carvalho****, com quem cresci imensamente nesses quase seis anos de orientação. Sou extremamente grata a Deus pelo privilégio de ter sido sua orientada. Obrigada por todas as conversas, todas as orientações endodônticas e de vida, pelo carinho e dedicação na minha trajetória. Tenho um imenso e eterno carinho por você e pela profa. Luciane.*

À ***Prof. Tit. Luciane Dias de Oliveira*** *por todo carinho, paciência e principalmente por toda a dedicação à pesquisa, em especial à realização deste trabalho, disponibilizando o laboratório e todo o conhecimento.*

À banca examinadora, ***Profa. Dra.*** **Vanessa Marques Meccatti Domiciano, Prof. Dr. Felipe de Souza Matos, Profa. Dra. Lillian Eiko Maekawa, Profa. Dra. Camilla Tiburcio Machado, Prof. Dr. Miguel Christian Castillo Marin, Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, Prof. Dr. Rafael Binato Junqueira** *por aceitarem o convite, fiquei muito feliz com as escolhas.*

Aos meus colegas de Pós-graduação da Endodontia, ***Aline, Beatriz, Felipe, Gustavo Assis, Gustavo Guerrero, Mariana, Camila, Rafael, Carol, Carol, Maryane, Patricia, Paulinha, Tayná, Eduarda, Gabi, Julia, Leila, Leticia, Marina, Mauro, Sabline*** *pelas risadas e por tornarem o processo mais divertido. Agradeço em especial a minha dupla de pós,* ***Mariana Gimenez*** *pela amizade, carinho, mas principalmente por me mostrar o que é ter força, Deus te colocou na minha vida e sou muito, muito feliz por isso. Ao meu amigo,* ***Felipe Moura*** *pela amizade, carinho e por dividir inúmeros momentos comigo, desde a pós-graduação, FSA e casos clínicos (rsrs). A minha amiga de laboratório,* ***Lara Carvalho****, que me ajudou a realizar esse trabalho e se tornou uma amiga. A minha aluna de IC,* ***Maria Eduarda*** *que me ajudou a realizar esse trabalho e também ao meu amigo* ***Gustavo Assis****. Obrigada!*

*Às minhas amigas da periodontia **Leticia Torquato** e **Clarissa Maciel** pela amizade, carinho e por dividirem tantos momentos comigo. Vocês foram presentes da unesp ou da perio ou da FSA.*

*Aos **meus alunos e a Faculdade Santo Antônio**, onde cresci imensamente nesses quatro anos lecionandos. Aprendi a ser mais resiliente, menos imediatista e compreendi a complexidade e a responsabilidade de estar do outro lado, como professora.*

*À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** – Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor, Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci, e da vice-diretora, Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira.*

*Ao Programa de **Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde – CASB** na pessoa do coordenador, Prof. Alexandre Luiz Souto Borges.*

E finalmente, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para esta conquista!

"É justo que muito custe o que muito vale". Santa Teresa D’Ávila

RESUMO

Rocha, CT. Avaliação da atividade antimicrobianas dos efeitos combinados e antibiofilme dos extratos de C*innamomum verum* e *Psidium guajava* como soluções irrigadoras sobre biofilme endodôntico em canais radiculares [*in vitro* e modelo *ex* vivo] [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

Enterococcus faecalis está normalmente associado ao insucesso do tratamento endodôntico devido a sua resistência ao protocolo de preparo e desinfecção usado durante o tratamento endodôntico, aumentando a resistência desses microrganismos a antimicrobianos e persistindo ou reinfectando o sistema de canais radiculares. O desenvolvimento de soluções terapêuticas mais naturais e sustentáveis para o tratamento de infecções endodônticas é especialmente relevante. Esse trabalho teve como objetivo: I) produzir e avaliar fitoquimicamente os extratos de *Psidium guajava* L. (goiabeira) *e Cinnamomum verum* (Canela); II) Determinar ação sinérgica dos extratos de *Psidium guajava* L. *e Cinnamomum verum*; III) Avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme sobre cepa clínica de *E. faecalis,* comparando com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl); IV) Avaliar ação antibiofilme contra cepa clínica de *E.* faecalis em modelo de dentes humanos unirradiculares. Para tanto, os extratos foram preparados, a ação antioxidante foi avaliada e o teor de flavonoides e fenóis determinados. A atividade antimicrobiana foi analisada pelo teste de microdiluição em caldo (CLSI M100-S15) para determinar concentração microbicida mínima (CMM). As concentrações mais efetivas na CMM foram analisadas em biofilmes monotípicos formados por 48 horas que foram colocados em contato pelo tempo de 20 minutos e quantificada a viabilidade pelo teste colorimétrico de MTT e pela contagem de unidade formadora de colônias (UFC/ml). Para avaliar a ação antimicrobiana em modelos unirradiculares de dentina, foram utilizados 60 dentes humanos unirradiculares, que tiveram suas coroas removidas, padronizadas no tamanho de 15mm, em seguida foram esterilizadas por radiação gama cobalto 60 e, só então cepa clínica de *E. faecalis* foi inoculada nos canais radiculares. Após 21 dias para a formação de biofilme, os dentes foram separados em cinco grupos (n=12) de acordo com a solução irrigadora: G1) Água apirogênica; G2) Solução de NaOCl 2,5%; G3) Combinação dos extratos de Canela e Goiabeira; G4): extrato de Canela isolado; G5): extrato de Goiabeira isolado e foi coletado o conteúdo do canal, para confirmação da contaminação microbiana;. Após foram instrumentados com limas do sistema Reciproc R40 e irrigados, e então realizadas a segunda coletas do conteúdo do canal radicular: S2: imediatamente após o preparo biomecânico (PBM), para avaliar a eficácia antimicrobiana dos agentes irrigantes. Dois dentes de cada grupo foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a contaminação. Os dados foram analisados por anova *one-way* e *Tukey* ou *Kruskal Wallis* e *Dunn* considerando o nível de significância ($p<0,05$), de acordo com o teste de normalidade. Os extratos de canela e goiabeira apresentaram ação bactericida sobre cepa clínica de *E. faecalis,* quando combinados, os extratos apresentaram associações aditivas e indiferentes. Para a inibição do biofilme os extratos apresentaram redução semelhante ao grupo controle com NaOCl 2,5%. Nos modelos *ex vivo* a instrumentação e a irrigação com os extratos vegetais puros reduziram 100%

(p<0,05) o biofilme formado e foi estatisticamente semelhante a atuação do NaOCl 2,5%. Em conclusão, os extratos de canela e goiabeira na forma isolada apresentaram atividade antimicrobiana e antibiofilme em cepas clínicas de *E. faecalis* durante preparo biomecânico. Desta forma, os extratos vegetais são promissores para futuras formulações de irrigantes na endodontia.

Palavras-chave: *Cinnamomum verum, Enterococcus faecalis,* Endodontia*, Periodontite apical, Psidium guajava.*

ABSTRACT

Rocha CT Evaluation of the antimicrobial activity of the combined and antibiofilm effects of Cinnamomum verum and Psidium guajava extracts as irrigating solutions on endodontic biofilm in root canals [in vitro and ex vivo model] [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2025.

Enterococcus faecalis is typically associated with endodontic treatment failure due to its resistance to the preparation and disinfection protocol used during endodontic treatment, increasing the resistance of these microorganisms to antimicrobials and persisting or reinfecting the root canal system. The development of more natural and sustainable therapeutic solutions for the treatment of endodontic infections is especially relevant. This study aimed to: I) produce and phytochemically evaluate extracts of Psidium guajava L. (guava) and Cinnamomum verum (cinnamon); II) determine the synergistic action of Psidium guajava L. and Cinnamomum verum extracts; III) evaluate the antimicrobial and antibiofilm action against a clinical strain of E. faecalis, comparing them with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl); IV) To evaluate the antibiofilm action against a clinical strain of E. faecalis in a model of single-rooted human teeth. Extracts were prepared, their antioxidant activity evaluated, and their flavonoid and phenol contents determined. Antimicrobial activity was analyzed by the broth microdilution test (CLSI M100-S15) to determine the minimum microbicidal concentration (MMC). The most effective MMC concentrations were analyzed in monotypic biofilms formed over 48 hours and placed in contact for 20 minutes. Viability was quantified by the colorimetric MTT test and colony-forming unit (CFU/ml) count. To evaluate the antimicrobial action in single-root dentin models, 60 single-root human teeth were used. Their crowns were removed and standardized to a size of 15 mm. They were then sterilized by cobalt-60 gamma radiation. Only then was a clinical strain of E. faecalis inoculated into the root canals. After 21 days for biofilm formation, the teeth were separated into five groups (n = 12) according to the irrigating solution: G1) Pyrogenic water; G2) 2.5% NaOCl solution; G3) Combination of cinnamon and guava extracts; G4): isolated cinnamon extract; G5): isolated guava extract and the canal content was collected to confirm microbial contamination. Afterwards, they were instrumented with Reciproc R40 system files and irrigated, and then the second collection of the root canal content was performed: S2: immediately after biomechanical preparation (PBM), to evaluate the antimicrobial efficacy of the irrigating agents. Two teeth from each group were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) to assess contamination. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn tests, considering the significance level ($p<0.05$), according to the normality test. Cinnamon and guava extracts showed bactericidal action against the clinical strain of E. faecalis; when combined, the extracts presented additive and indifferent associations. For biofilm inhibition, the extracts showed a similar reduction to the control group with 2.5% NaOCl. In ex vivo models, instrumentation and irrigation with pure plant extracts reduced the biofilm formed by 100% ($p<0.05$), and the performance was statistically similar to that of 2.5% NaOCl. In conclusion, cinnamon and guava extracts, in isolation, showed antimicrobial and antibiofilm activity against clinical strains of E. faecalis during biomechanical

preparation. Therefore, plant extracts hold promise for future irrigant formulations in endodontics.

Keywords: Cinnamomum verum, Enterococcus faecalis, Endodontics, Periapical Periodontitis, Psidium guajava

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DE LITERATURA 20
2.1 Infecção endodôntica secundária/persistente 20
2.2 Soluções irrigadoras na Endodontia 22
2.3 Fitoterapia na Odontologia 25
3 PROPOSIÇÃO 28
4 MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1 Produção do extrato vegetal 29
4.1.1 Determinação de teor de sólidos 29
4.1.2 Determinação da atividade supressora de radicais livres do extrato hidroetanólico de *Psidium guajava* L. e de *Cinnamomum verum* (atividade antioxidante) 30
4.1.3 Determinação de flavonoides totais 30
4.1.4 Determinação do teor de fenóis totais 32
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme 33
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato *Psidium guajava* L. e de *Cinnamomum verum* 33
4.2.2 Determinação das associações dos extratos por meio do método de microdiluição *Checkerboard* 34
4.3 Avaliação da atividade antibiofilme dos extratos 35
4.3.1 Determinação 35
4.3.2 Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) 37
4.4 Avaliação da atividade antibiofilme dos extratos em espécimes 37
4.4.1 Preparação dos espécimes 37
4.4.2 Contaminação dos espécimes 39
4.4.3 Divisão dos Grupos experimentais 40
4.4.4 Protocolo de Preparo Biomecânico (PBM) 41
4.4.5 Coletas para análise 42
4.4.6 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 44

4.5 Análise Estatística.....45
5 RESULTADO.....46
5.1 Extratos.....46
5.1.1 Teor de sólidos solúveis.....46
5.1.2 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante) 46
5.1.3 Determinação de flavonoides totais nas amostras dos extratos.....48
5.1.4 Determinação de fenóis totais nas amostras dos extratos 49
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em culturas planctônicas 51
5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos *Psidium guajava* L. e *Cinnamomum verum* 51
5.2.2 Ensaio de microdiluição *checkerboard* das associações dos extratos 52
5.3. Avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais.....53
5.3.1 Avaliação antibiofilme por meio de análise de MTT 53
5.3.2 Avaliação antibiofilme após plaqueamento por meio de análise de UFC/mL 54
5.4 Avaliação da atividade antibiofilme dos extratos em espécies 55
5.4.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 57
6 DISCUSSÃO.....60
7 CONCLUSÃO 66
REFERÊNCIAS 67
ANEXO 81

1 INTRODUÇÃO

O objetivo primordial do tratamento endodôntico é prevenir, reduzir ou eliminar microrganismos a níveis que sejam compatíveis com a cura e com a resposta imunológica do hospedeiro, além de prevenir a recontaminação do sistema de canais radiculares (SCR) (Ørstavik, 2020; Barbosa-Ribeiro et al., 2020; Jain e Ranjan, 2014; Rôças e Siqueira 2010). Desta forma o sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação de microrganismos presentes no sistema de canal radicular por meio da limpeza e modelagem (Schilder, 1974). A forma mais eficaz de redução de biofilme microbiano e seus subprodutos no SCR é o preparo biomecânico (PBM) (Cavalli et al., 2017). O PBM é realizado por meio dos instrumentos endodôntico e da solução irrigadora (Abu Hasna et al., 2020b).

O tratamento endodôntico é muito mais complexo do que uma simples técnica; é necessário compreender as infecções endodônticas e adotar abordagens eficazes para combatê-las por meio do PBM. A instrumentação mecânica sem o uso de agentes antimicrobianos é completamente insuficiente (Rossi-Fedele e Rödig 2023; Schilder, 1974). Evidências revelaram que a instrumentação é incapaz de atingir grande parte do sistema de canais radiculares, devido à complexidade anatômica (istmos, canais laterais/secundários) (Versiani et al., 2023; Karobari et al., 2022b; Vasudeva et al., 2017), bem como pela colonização de microrganismos: no *lúmen* do canal principal, nos túbulos dentinários e no biofilme periapical (Ricucci et al., 2009; Ricucci e Siqueira, 2010). Essas regiões não podem ser limpas por meio da instrumentação e frequentemente retem tecido necróticos e detritos contaminados mesmo após o PBM (Ricucci et al., 2009; Ricucci e Siqueira, 2010). No estudo de Friedman (2017) reforça que 5 a 15% dos tratamentos endodônticos que atendem ao padrão aceitável de desinfecção, apresentam insucesso do tratamento. A persistência de microrganismos que sobrevivem ao tratamento endodôntico (preparo biomecânico, medicação intracanal e obturação) mantem a infecção intracanal, ocasionando a periodontite apical secundária/persistente (Siqueira et al 2024; Rôças e Siqueira 2010, Godoi-Jr et al., 2023; Francisco et al., 2019; Prada et al., 2019).

A microbiota responsável pela periodontite apical secundária/persistente é descrita como polimicrobiana e heterogênea, com prevalência de microrganismos

Gram-positivos e presença de anaeróbios estritos Gram-negativo que estão organizados em biofilmes (Godoi-Jr et al., 2023; Barbosa-Ribeiro et al., 2020; Svensäter e Bergenholtz, 2005). Esses microrganismos possuem fatores de virulência como ácido lipoteicoico e endotoxinas, respectivamente (Godoi-Jr et al., 2023). As endotoxinas estimulam macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de muitos mediadores químicos inflamatórios que levam a uma série de efeitos biológicos com consequente inflamação, reação imune e reabsorção óssea periapical (Maekawa et al 2013). Em dentes com infecção pós-tratamento, os gêneros mais prevalentes são *Streptococcus, Enterococcus, Fusobacterium, Actinomyces, Pseudoramibacter, Pseudomonas e Propinibacterium* (Siqueira et al., 2024).

Enterococcus spp. descritos primeiramente por Sherman em 1937 (Kayaoglu et al., 2011) é um coco anaeróbio facultativo Gram-positivo oportunista. *Enterococcus faecalis* apresenta potencial para causar diversas infecções, incluindo infecções do trato urinário, em feridas, bacteremia e endocardite (Sharma et al., 2025b). É frequentemente encontrado em dente com periodontite apical secundária/persistente (Lins et al., 2019; Andrade et al 2011, Kayaoglu et al., 2011, Lins et al., 2013). Estudos apontam que *E. faecalis* é a espécie mais comumente isolada - 77 a 100% das amostras de pacientes com falha no tratamento endodôntico (Sharma et al., 2025 a; Barbosa-Ribeiro et al., 2020; Siqueira e Roças, 2004).

Essas descobertas demonstram que *E. faecalis* é capaz de sobreviver em condições hostis do sistema de canais radiculares: (i) em ambientes com nutrientes escassos (Ferreira et al., 2015; Murad et al., 2014) , (ii) sobrevivem a ação de medicações intracanais e irrigantes do sistema de canais radiculares (Kayaoglu et al., 2011), (iii) suportam pH alcalino, por volta de 9,6 (Kayaoglu et al., 2011), (iv) apresentam resistência a antimicrobianos (metronidazol, tetraciclinas e beta-lactâmicos (Sharma et al., 2025b; Elashiry et al., 2023). Além disso, a complexidade anatômica do canal radicular, o pequeno diâmetro apical, a penetração ineficiente de irrigantes antimicrobianos, podem acarretar a persistente de bactérias residuais (Kumar et al., 2025; Hülsmann et al., 2025, Siqueira e Roças 2008). Por essas razões, *E. faecalis* deve ser um dos microrganismos alvo para estratégias terapêuticas durante o tratamento ou retratamento endodôntico (Elashiry et al., 2023) a fim de reduzi-lo, devido a sua grande resistência a antimicrobianos, aumentando a probabilidade de sucesso.

Diferentes substâncias antimicrobianas e modalidades avançadas de ativação de irrigantes são pesquisadas para melhorar a desinfecção do sistema de canais radiculares, visando a penetração e a ruptura do biofilme microbiano (Abbaszadegan et al., 2016; Jain et al., 2014). O hipoclorito de sódio (NaOCl) e digluconato de clorexidina (CHX) são substâncias irrigadoras amplamente empregados no PBM durante o tratamento endodôntico (Ruksakiet et al., 2020). Embora o NaOCl e a CHX apresentem redução significativa de espécies bacterianas (Rôças e Siqueira, 2011), demonstram citotoxicidade aos tecidos periapicais (Jain et al., 2014) e atividade oxidante, alterando propriedades mecânicas da dentina (Cai et al., 2023; Xu et al., 2022; Pascon et al., 2009). Portanto, o emprego de diferentes técnicas e substâncias com potencial antimicrobiano continuam sendo uma das principais prioridade da terapia endodôntica (Babeer et al., 2024).

O uso de plantas medicinais no combate a microrganismos presentes nas infecções endodônticas vem demostrando resultados significativos (Santos et al., 2023, Karobari et al., 2022a; Vasudeva et al., 2017; Abbaszadegan et al., 2016; Dubey et al., 2016; Maekawa et al., 2013; Cavalcanti et al., 2011; Kayaoglu et al., 2011). Com os avanços científicos, mais pesquisas foram conduzidas para introduzir novos compostos com propriedades medicinais permitindo que os cientistas encontrassem compostos alternativos e eficazes com baixos efeitos colaterais, fácil acessibilidade, bom custo-benefício e alto potencial terapêutico (Wijesinghe et al., 2021; Wijesinghe et al., 2020).

Os produtos naturais têm uma forte tendencia de conquistar espaço para tratamento de infecções (Rocha et al., 2025), devido ao principal propósito de interagir com os sistemas biológicos e sua vasta gama de diversidade química e estrutural que atende complexidades acima do que os compostos sintéticos possuem, bem como suas associações sinérgicas (bioativos e seus subprodutos) (Porras et al., 2021). A formulação à base de plantas pode conter fitoquímicos com atividade antibacteriana e efeitos adjuvantes que podem neutralizar conteúdos sépticos infecciosos.

O gênero Cinnamomum, popularmente conhecida como canela, é uma arvore perene e uma planta medicinal da antiguidade (Liyanage et al., 2017). As diferentes partes da canela apresentam atividade antifúngicas contra células planctônicas e biofilme de *Candida* spp. (Wijensinghe et al., 2021), atividade antioxidante (de Lima et al., 2022), atividade antibiofilme contra cepas multirresistentes e biofilme de

Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa* (Meccatti et al., 2023), atividade de sinergismo com antibióticos convencionais (de Lima et al., 2022) e não apresenta efeito tóxico nos queratinócitos humanos (Wijensinghe et al., 2021).

O gênero Psidium, pertence à família *Myrtaceae* apresenta folhas simples e opostas originaria da América tropical e subtropical, a espécie mais conhecida é *Psidium guajava Linn ou*, goiabeira, produtora do fruto goiaba (de Souza et al., 2021; Rattanachaikunsopon et al., 2007). Diferentes partes da planta são amplamente utilizadas como fitoterápicos para tratar doenças como gastroenterites, dor no estômago e feridas (Majhi et al., 2023; Arévalo-Marin et al., 2021).

Folhas de *P. guajava* possuem propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, P. aeruginosa* (Cheruiyot et al., 2009), *E. faecalis* (Dubey, 2016) e *Salmonella Enteritidis* (de Souza et al., 2021), propriedades anti-inflamatória e reduzem a capacidade de ligação hidrofóbica da superfície celular bacteriana (Razak et al. 2006). Investigações farmacológicas indicaram que a casca, frutos e folhas possuem atividade antibacteriana, hipoglicêmica anti-inflamatória, analgésica, antipirética, espamólitica e depressora do Sistema Nervoso Central (Begum et al., 2002).

Os protocolos de desinfecção com irrigantes antimicrobianos impactam estrategicamente nos resultados do tratamento endodôntico (de Gregorio et al., 2015), isso porque o tratamento endodôntico apresenta porcentagem de sucesso de 92,3% em dentes com polpa viva e 82,7% em dentes com periodontite apical (Ricucci e Siqueira 2011; Ng et al., 2011). Essa porcentagem não sofreu alteração quando comparada com um estudo realizado a mais de meio século (Strindberd, 1956). Por essa razão centenas de estudos são realizados e publicados anualmente sobre irrigantes endodônticos (Jain et al., 2014). No entanto, a resistência antimicrobiana a protocolos convencionais do *E. faecalis* aumentou consideravelmente (Sharma et al., 2025b; Lins et al., 2013), autores afirmam que são necessárias novas estratégias de tratamento a fim de direcionar a ruptura do biofilme e explorar novas alternativas antimicrobianas (Sharma et al., 2025b; Rocha et al., 2025; Santos et al., 2023; Sharma et al, 2023; Ooi et al., 2019; Jhamb et al., 2019)

Assim, torna-se imprescindível investigar estratégias alternativas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes no combater as atuais infecções bacterianas. Nesse contexto, a introdução de métodos voltados ao controle e à

erradicação de biofilmes apresenta-se como uma abordagem essencial para o tratamento de infecções de biofilme endodônticos. Os estudos encorajam o desenvolvimento de novas pesquisas com simulação biofilme de *E. faecalis* em canais radiculares e avaliar a eficácia antibacteriana dos compostos de *P. guajava* e *C. verum* utilizando-os como irrigante no preparo biomecânico. Não foram encontrados na literatura consultada avaliação antimicrobiana da combinação de extratos de *Psidium guajava L.* e *Cinnamomum verum* sobre biofilme de *E. faecalis* em modelos de raízes unirradiculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção endodôntica secundária/persistente

As infecções endodônticas representam a principal causa da doença endodôntica e periapical (Arnold et al., 2013; Wang et al., 2025; Boutsioukis et al., 2022; Chavez da Paz, 2007). Bactérias remanescentes no sistema de canais radiculares desempenham um papel significativo na persistência de lesões periapicais causando falha no tratamento endodôntico (Barbosa – Ribeiro et al., 2020). Conhecer os microrganismos que estão presentes nas lesões apicais perirradiculares e na região apical das raízes com tratamento endodôntico é de extrema importância, uma vez que, a região apical é a zona crítica para o controle de infecções (Siqueira et al., 2024). Dependendo da localizaçao dessa infecção, bactérias podem se disseminar, resultando em infecções maxilosfaciais potencialmente fatais (Wang et al., 2025).

Na região apical encontra-se a maior quantidade de canais acessórios, somando a isso há redução de oxigênio, na qual proteínas e glicoproteínas presentes no exsudato inflamatório tornam-se a principal fonte de nutrientes para microrganismos. Favorecem o estabelecimento de bactérias anaeróbias obrigatórias que são inflamofílicas e utilizam de proteínas como fonte de energia, bem como bactérias que sobrevivem em ambiente hostil (Siqueira et al., 2024, Thi et al., 2020). A infecção endodôntica é um processo dinâmico que envolve bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas (Wang et al., 2025).

Apesar do avanço em tecnologia na endodôntica com instrumentação mecanizada e novos meios de irrigação é difícil erradicar os microrganismos do sistema de canais radiculares (Cotter e Panzarino 2006), principalmente devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares em que grandes porções são deixadas intocadas durante o preparo biomecânico. A formação de um agregado complexo de bactérias envolto em uma matriz autogerada de substâncias poliméricas extracelulares, conhecida como biofilme bacteriano (Thi et al., 2020; Rollet et al., 2009) representa a principal forma de organização dos microrganismos fixados a uma superfície vivendo em uma matriz extracelular polimérica e são mais resistentes aos

tratamentos antimicrobianos em comparação com células planctônica (Siqueira e Rôças, 2022; Wijesinghe et al., 2021, Lewis, 2001). A matriz extracelular polimérica cria uma barreira física que dificulta a difusão de antimicrobianos, bem como a neutralização de suas propriedades (Boutsioukis et al., 2022). Essa estratégia de sobrevivência bacteriana permite que o biofilme resista a condições de vida escassez com pouca disponibilidade de nutrientes (Thi et al., 2020), resultando na permanência da infecção, ocasionando a falha do tratamento endodôntico (Karobari et al., 2022a).

Enterococcus faecalis é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva, normalmente encontrada no trato gastrointestinal e na cavidade pulpar, especificamente presente em grande quantidade quando há falhas no tratamento endodôntico e é responsável pelas infecções persistentes (Alarcón-Sánchez et al., 2025; Godoi-Jr et al., 2023; Alghamdi et al., 2020; Barbosa – Ribeiro et al., 2020; Maekawa et al., 2013) . Essa patogenicidade é atribuída a diversos fatores de virulência (Sharma et al., 2025b), como resistência *de E. faecalis* a agentes antimicrobianos (Saatch et al., 2014), capacidade de penetrar túbulos dentinários (Guneser, et al 2015), aderir ao colágeno na presença de soro humano e sua capacidade de formar biofilmes que fornecem proteção contra agentes antimicrobianos e defesas imunológicas do hospedeiro (Arias-Moliz e Ferrer-Luque 2020). *E. faecalis* desempenha um papel importante na persistência da infecção endodôntica e manutenção de alterações crônicas em dentes com tratamento endodôntico (Maekawa et al., 2013) devido a resistência do biofilme de *Enterococcus faecalis* ao PBM, aumentando a resistência desses microrganismos a antimicrobianos e persistindo ou reinfectando o sistema de canais radiculares (Alarcón-Sánchez et al., 2025). No estudo de Sharma et al., (2025b) apontam que cepas isoladas de *E. faecalis* de tratamentos endodônticos com insucesso apresentaram 66% de capacidade de formação de biofilme, corroborando com o estudo de Saffari et al (2018) que observou 60 a 70% dos isolados de *E. faecalis* também apresentaram essa capacidade.

No estudo de Siqueira e Roças (2004) demostraram que na cavidade oral humana, *E. faecalis* é uma das bactérias mais comuns, causando aproximadamente 77% das infecções endodônticas. No estudo de Barbosa – Ribeiro et al., (2020) *E. faecalis* foi detectado em 100% das amostras iniciais reduzindo apenas para 10% após o retratamento endodôntico, corroborando com esse achado o estudo de Sharma et al., (2025a) afirma que após a coleta microbiológica com *swab* oral, pontas

de papel e remanescente de guta percha *E. faecalis* foi o principal microrganismos encontrado e em todas as amostras, em casos de infecções endodônticas persistentes.

A revisão de sistemática e meta-análise de Alarcón-Sánchez et al. (2025) teve como objetivo determinar a prevalência de *E. faecalis, P. gingivalis, T. forsythua e T. denticola* analisados pela técnica de *Checkerboard* para hibridização DNA-DNA em infecções endodônticas e concluíram que a média de prevalência maior foi de *E. faecalis* (74%), e que compromete a eficácia do procedimento e ocasiona infecções recorrentes, seguido pela média de prevalência de e *P. gingivalis* (63%), *T. denticola* (58%) e *T. forsythia* (46%).

A microbiota de infecções endodônticas secundárias/persistentes compreende uma comunidade polimicrobiana, predominantemente de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estas são detectadas entre 53,5% e 65,5% (Godoi-Jr et al., 2023) justificando a manutenção das lesões periapicais, a partir de endotoxinas, sendo o principal fator de virulência desses microrganismos (Barbosa – Ribeiro et al., 2020).

2.2 Soluções irrigadoras na Endodontia

O controle de infecções com substâncias antimicrobianas é imperativo na erradicação de microrganismos do sistema de canais radiculares a fim de prevenir e curar infecções, como a periodontite apical (Boutsioukis et al., 2022; Ørstavik, 2020; Barbosa-Ribeiro et al., 2020; Jain et al., 2014; Roças e Siqueira 2010). Desta forma o tratamento endodôntico envolve, entre suas principais etapas, o preparo biomecânico (PBM), associação conjunta de substância química irrigadora e a instrumentação (Cavalli et al., 2017).

Os principais requisitos para a solução irrigadora ideal são: dissolução de matéria orgânica (Taylor, 1917), inativação de fatores de virulência como ácidos lipoteicóicos e endotoxinas, ter atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos planctônicos e organizados em biofilme, baixa viscosidade (grande molhamento), ausência de efeitos adversos tanto locais (tecidos periapicais e dentina)

como sistêmicos (toxicidade e reações alérgicas), prevenir o escurecimento da coroa, facilitar a instrumentação, capacidade de prevenir o desenvolvimento de uma camada de esfregaço e ampla disponibilidade a baixo custo(Boutsioukis et al., 2022; Karobari et al., 2022a; Jain et al., 2014).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) está entre a solução química auxiliar (SQA) mais utilizada como irrigante durante o PBM (Iqbal, 2012; Dutner et al., 2012). Dentre as propriedades mais relevantes estão seu amplo espectro de ação microbiano contra microrganismos organizados em biofilmes e sua capacidade de dissolução de matéria orgânica (Dubey et al., 2016; de Gregório et al., 2015; Taylor, 1917), biofilme e restos pulpares (Ruksakiet et al., 2020). Ademais reduzem fatores de virulência como o ácido lipoteicoicos e as endotoxinas (Hong et al., 2016), auxiliam na lubrificação do canal principal no momento da instrumentação (Boessler et al., 2007) e apresentam baixo custo. Ainda não há um consenso sobre a concentração ideal, estudos apontam o uso de 0,5% a 5,25% (Prasad et al., 2024).

Os efeitos indesejáveis do NaOCl permeiam seu potencial alérgico, toxicidade, sabor e odor desagradável e a incapacidade de remover a camada de esfregaço (Jain et al., 2014). Devido à sua natureza caustica a extrusão além dos limites da raiz em tecidos periapicais e/ou espaços de tecido da cavidade oral podem acarretar acidentes de NaOCl (Vivekananda Pai et al., 2023), embora estudo recente relate a frequência de extrusão de NaOCl e acidente de NaOCl foi de 0,89% e 0,18% respectivamente (Özdemir et al., 2022).

O uso conjunto do hipoclorito de sódio com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi empregado para remover a camada de esfregaço. Seu contato ocorre com íons de cálcio na dentina promovendo a quelação do cálcio na dentina resultando na desmineralização da dentina em 5 min a 20-30 μm de profundidade (Silva et al., 2013).

Existem evidências sobre a relação da concentração de NaOCl e resistência mecânica da dentina (Cai et al., 2023). Acredita-se que o uso conjunto de NaOCl com uma substância quelante pode reagir com o colágeno da matriz de dentina radicular alterando o módulo de elasticidade, resistência à tração e flexão e a microdureza (Cai et al., 2023; Xu et al., 2022; Pascon et al., 2009). Assim, a busca por outros irrigantes com menor potencial para induzir efeitos colaterais adversos é desejável.

As propriedades antimicrobianas do digluconato de clorexidina (CHX) tem sido bastante difundida no controle de biofilme dental em paciente com doença

periodontal (Manthena et al., 2014). Assim, foi disseminada na Endodontia para ser usada como SQA no PBM. O principal argumento a favor da CHX é sua capacidade de se fixar à dentina e exercer um efeito antimicrobiano prolongado (substantividade), prevenindo uma possível recolonização bacteriana após tratamento endodôntico (Okino et al., 2004). Além disso, apresentam amplo espectro de ação microbiano. Sua limitação mais significativa é a incapacidade de dissolução de matéria orgânica (biofilme e tecido pulpar) (Okino et al., 2004).

No estudo de Maekawa et al., (2011) avaliaram a eficácia das substâncias químicas auxiliares, hipoclorito de sódio 2,5% e gel de clorexidina 2% em dentes com infecção prévia com *Eschericha coli* em comparação com solução salina e concluíram que ambas as substâncias foram capazes de eliminar o *E. coli* do lúmen do canal radicular e reduziram a quantidade de suas endotoxinas.

Na revisão de literatura e metanálise de Ruksakiet et al. (2020) concluíram ambos reduzem a carga microbiana do sistema de canais radiculares, mas não a eliminam completamente, por essa razão centenas de estudos são publicados anualmente sobre irrigantes endodônticos. A fim de superar as desvantagens das principais SQA o uso de alternativas fitoterápicas na Odontologia e na Endodontia tem sido bastante estudado, devido à sua alta atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedade anti-inflamatória e antioxidade (Jain et al., 2014).

Estudos relataram a ocorrência de infecção bacteriana em dentes com periodontite apical pós-tratamento devido a persistência de bactérias em istmos (Ricucci e Siqueira 2010), canais laterais (Ricucci e Siqueira 2010; Nair et al., 1990) ramificações apicais (Mickel et al., 2007), túbulos dentinários (Siqueira Jr et al., 2018; Vieira et al., 2012; Mickel et al., 2007).

Na tentativa de contornar tais limitações do PBM, irrigação e instrumentação, novas estratégias são usadas para alcançar não apenas o lúmen do canal principal, mas também todo o sistema de canais radiculares. Estudos microbiológicos afirmam que aumentar o diâmetro da porção apical durante o preparo do canal para otimizar a desinfecção e limpeza, no entanto vale salientar que esse aumento deve ser suficientemente seguro a fim de evitar acidentes e consequentemente apresente uma ação antibacterianos (Rodrigues et al., 2017; Mickel et al., 2007). A associação de medicações intracanais entre as consultas, demostrando diminuição na eliminação bacteriana após o preparo (Khoury et al., 2024; Valera et al., 2016).

2.3 Fitoterapia na Odontologia

Os extratos de ervas têm sido usados há séculos em diferentes culturas devido aos seus efeitos analgésicos e antinflamatórios, possuem características farmacodinâmicas e integram com receptores de forma semelhante aos medicamentos convencionais (Yunes et al., 2004). O mecanismo de ação desses extratos de ervas são frequentemente multifatoriais e envolvem interações com receptores neurotransmissores, modulação de mediadores inflamatórios e inibição de enzimas relacionados à dor (Barrera et al., 2024; Weiner e Ernst, 2004).

No estudo de Santos et al (2023), observou-se que os extratos hidroalcoólicos de *S. officinalis* e *G. glabra*, quando combinados exibiram efeito aditivos e sinérgico contra biofilme de *E. faecalis* e *Enterococcus faecium* no período de 5 minutos e 24 horas. Corroborando com esses estudo o estudo de Guneser et al. (2016) demonstraram que o extrato metanólico de *S. officinalis* apresenta redução bacteriana de *E. faecalis* em espécimes de canais radiculares.

No estudo de Maekawa et al (2013) avaliaram a ação antibacteriana e antiendotoxina do extrato de própolis glicólica e gengibre em combinações com CHX como medicação intracanal contra *Candida albicans, E. faecalis*, *Escherichia coli* e endotoxinas. Foi observado atividade antimicrobiana do extrato de gengibre sobre três anaeróbios Gram-negativos, *Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia* (Park et al., 2008).

Dentre os diversos extratos naturais disponíveis, destaque-se o interesse pelos extratos *de Psidium guajava* (goiabeira) e *Cinnamomum verum* (canela).

O gênero *Cinnamomum* consiste em quase 250 espécies distribuídas no Sul, Leste e Sudeste da Ásia e Austrália, a mais conhecida é *Cinnamomum verum* e popularmente Canela (Liyanage et al., 2017). Os principais compostos extraídos da canela são cinamaldeído, eugenol, fenol e linalol. O óleo essencial da casca da canela tem um maior teor de cinamaldeído (65-80%) e um baixo teor de eugenol (5-10%). O extrato das folhas é rico em eugenol (10-95%), e as raízes são ricas em cânfora. (Yanakiev, 2020).

No estudo de Cavalcanti et al., (2017) o efeito antimicrobiano do extrato de *C. verum* foi significante contra *C. albicans* e *E. faecalis*, com uma zona de inibição pelo

método de difusão em ágar mais ampla em comparação com digluconato de clorexidina (0,12%) e solução de hipoclorito de sódio 1%. Wiwattanattanabut et al. (2017), avaliaram a atividade do extrato de *C. verum* contra patógenos de duas bactérias cariogênicas: *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, demostrando que houve atividade antimicrobiana. No estudo de Irshad et al (2025) avaliaram o potencial antimicrobiano dos extratos aquosos, metanólicos, etanólicos e acetônicos de *Malus domestica* (maça), *C. verum* (canela) e *Trachyspermum ammi* (ajwain) por meio de métodos de difusão em ágar e a concentração inibitória mínima contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella typhi* ATCC 19430 e observaram que o extrato metanólico e acetônico apresentaram zona de inibição de 22,3 ± 0,58mm para *C. verum* contra *S. aureus*.

Alguns estudos se concentraram nos efeitos antimicrobianos de diferentes espécies de *Cinnamomum* contra certos patógenos endodônticos. No estudo de Abbaszadegan et al., (2016) o óleo essencial da casca de *C. zeylanicum* destilado ao vapor contra *E. faecalis* ATCC 29212 apresentou concentração inibitória mínima de 0,01 mg/mL e concentração bactericida mínima de 0,1 mg/mL. O extrato de *C. verum* apresenta atividade antifúngica em células planctônicas de *Candida* spp. e biofilme agindo na integridade da parede celular (Wijesinghe et al., 2021), atividade antimicrobiana em *Acinetobacter* spp*., Bacillus* spp*., Enterobacter* spp*., Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Klebsiella pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, não apresenta efeito tóxico em queratinócitos humanos (Wijesinghe et al., 2021).

No estudo de Panchal et al., (2020) avaliação a atividade antibacteriana dos extratos de *Cinnamomum*, extrato de *Azadirachta indica* (Neem) e hipoclorito de sódio 3% como irrigante contra *E. faecalis* ATCC 29212. Foram utilizados 60 dentes unirradiculares, previamente incubados com *E. faecalis* por um período de 21 dias. Após a incubação, foi realizada a irrigação intracanal nos diferentes grupos experimentais. Em seguida, foram coletados o conteúdo intracanal e semeados em ágar para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os valores de UFC foram 0,72 x 10^3, 0,25 x 10^3 e 0,4 x 10^3 para extratos de Neem, extrato de Cinnamomum e NaOCl, respectivamente. Desta forma, os irrigantes de extratos não apresentaram resultado estatisticamente significante quando comparados com NaOCl.

O gênero Psidium, pertence à família *Myrtaceae* apresenta folhas simples e opostas, é uma árvore frutífera originaria da América tropical e subtropical (Majhi et al., 2023; Arévalo-Marín et al., 2021), a espécie mais conhecida é *Psidium guajava ou*, goiabeira, produtora do fruto goiaba (Gutierrez Montiel et al., 2023; de Souza et al., 2021; Rattanachaikunsopon et al., 2007). A valorização das folhas de goiaba é uma oportunidade para os produtores, devido à grande disponibilidade. No entanto, podem ocorrer alterações de composição fitoquímicas devido a localização geográfica, condições climáticas e presença de diferentes patógenos (Gutierrez Montiel et al., 2023).

No estudo de Dubey (2016) realizou teste de difusão em disco de ágar de MTAD, *E. officialis* e *P. guajava* contra *E. faecalis*. Concluíram que *E. officialis* e as folhas de *P. guajava* mostraram efeito antimicrobiano contra *E. faecalis*. Os flavonoides responsáveis pela atividade antimicrobiana da *P. guajava* foram quercetina, morin-3-0-lyxoside e quercetina-3-0-arabioside. A atividade antimicrobiana ocorreu devido a sua capacidade de complexar com propriedade extracelular e solúveis, e de complexar com paredes celulares microbianas.

No estudo de de Souza et al., (2021), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Psidium cattleianum* e de *Psidium guajava* contra cepas padrão de oito bactérias *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli, Listeria monocytogenes Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica sorotipo Typhimurium e Salmonella enterica sorotipo Enteritidis* e três fungos filamentosos*, a saber, Aspergillus flavus, Aspergillus niger e Fusarium oxysporum,* pelo método de difusão em discos em ágar, houve zona de inibição das amostras de *Salmonella Enteritidis e P. aeruginosa.*

A crescente demanda por produtos naturais e à base de plantas em cuidados orais estimulou a pesquisa e o desenvolvimento no uso de extratos de ervas para a promoção da saúde bucal e prevenção de doenças.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos gerais deste estudo foram produzir os extratos de *Psidium guajava* L. e *Cinnamomum verum*, avaliar a atividade antimicrobiana e a determinar as concentrações das combinações para efeitos antimicrobianos dos extratos fitoterápicos *Cinnamomum verum* e *Psidium guajava* L. sobre cepa clínica de *E. faecalis* , em cultura planctônica, biofilmes e em raízes unirradiculares.

Os objetivos específicos do estudo foi:

a. Produzir e avaliar fitoquimicamente os extratos hidroetanólico de *Psidium guajava* L. (goiabeira) e *Cinnamomum verum* (canela), determinando o teor de fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante;

b. Determinar a concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos de *P. guajava* e *C. verum* sobre cepas clínicas de *E. faecalis*;

c. Avaliar a atividade antimicrobiana das combinações dos extratos de *P. guajava* e *C. verum* sobre cepas clínicas de *E. faecalis* pelo método de microdiluição *Checkerboard.*

d. Avaliar a ação antibiofilme dos extratos de *P. guajava* e *C. verum* e suas associações em comparação com o hipoclorito de sódio sobre cepa clínica de *E. faecalis* em modelo de biofilme por 20 minutos, modelo *in vitro*;

e. Avaliar a ação antibiofilme dos extratos *P. guajava* e *C. verum* e sua associação em comparação com o hipoclorito de sódio sobre cepa clínica de *E. faecalis*, em modelo de canais radiculares, modelo *ex vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comite de Ética e Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos, número do parecer:7.389.222 (ANEXO A).

4.1 Produção do extrato vegetal

O extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. (goiabeira) foi preparado a partir dos brotos de folhas que após colhidas foram secas no escuro entre 20-27 ºC por 5 dias, o extrato de *Cinnamomum verum* (canela) foi preparado a partir do pau da canela, já seco. Os materiais vegetais seco foram moídos em liquidificador. O veículo utilizado para extração foi etanol absoluto (álcool etílico 99.5% - Merck Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura obtida em sistema Milli-Q® (EtOH:H2O / 50:50), seguindo a proporção 30 g da matéria-prima para cada 100 mL do veículo, com tempo de extração de 48 h. Por fim, os extratos foram filtrados em duas etapas: filtração para remoção dos resíduos sólidos (filtro de papel com microfuros) e filtração para esterilização (filtro de membrana 0,22 µm).

4.1.1 Determinação de teor de sólidos

Seis béqueres vazios de 25 mL foram pesados e os pesos anotados. Após, foram pipetados 5 mL dos extratos em cada um deles (triplicata) e mantidos em estufa a 80ºC entre 24h e 48h. Ao estarem secos, os béqueres foram colocados em dessecador até o total esfriamento e em seguida foram pesados. A quantidade de sólidos solúveis nos extratos foi quantificada a partir da fórmula abaixo:

$$\%\ sol.sol\acute{u}veis\ \left(\frac{m}{v}\right) = (m-b)x\ 100/V\alpha$$

Onde: b= massa do béquer, m = massa final do extrato, após secagem, Vα = volume pipetado no Becker

4.1.2 Determinação da atividade supressora de radicais livres do extrato hidroetanólico de *Psidium guajava* L. e de *Cinnamomum verum* (atividade antioxidante)

As amostras foram preparadas em diferentes diluições baseadas na quantidade de sólidos solúveis determinada anteriormente. Calculou-se o volume de extrato necessário para preparar as diluições a 1% V/V e a 0,01% V/V. A alíquota calculada da solução a 1% V/V foi adicionada em um balão de 10 mL e o volume total completado com etanol. Preparou-se as diferentes diluições do extrato a 0,01% V/V. Neste momento, onze tubos de ensaio foram enumerados de 0 até 10. Adicionou-se o volume de etanol e solução do extrato (nesta ordem) em cada tubo. O tubo nº zero consistiu no controle, ou seja, 100% de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) sem extrato vegetal. Adicionou-se o volume de DPPH no 1º. tubo e aciona-se o cronômetro, desligando o mesmo após um minuto. Adicionou-se o DPPH nos outros tubos a cada um minuto, agitando os tubos periodicamente. A leitura no espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) em 517 nm foi iniciada após 30 minutos da adição do DPPH no 1º. tubo. Todas as leituras foram feitas em triplicatas e os valores de absorbâncias foram plotados em um gráfico Absorbância (em %) X concentração do extrato vegetal (μg/mL). Calculou-se a Concentração efetiva 50% (CE_{50}) (μg/mL) pela planilha, pelo método dos mínimos quadrados.

4.1.3 Determinação de flavonoides totais

Para a determinação do teor de flavonoides totais, foi preparada uma solução estoque de 100 µL do extrato em um balão volumétrico de 10 mL onde foi acrescentado metanol (álcool metílico absoluto – Êxodo científica, Sumaré, Brasil) até completar o menisco (solução estoque do extrato). O procedimento foi feito a partir deste ponto em triplicata. Retirou-se uma alíquota de 200 µL desta solução para transferir para um balão de 10 mL, já com ~ 5 mL de metanol. Adicionou-se 200 µL de cloreto de alumínio (AlCl3) e completou-se o volume até próximo de 10 mL com metanol. A solução foi agitada e colocada no banho-maria (Generalmed, São Paulo, Brasil) por 30 minutos a 20°C (figura 1). Após este tempo, acertou-se o menisco e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 425 nm (Micronal B-582, São Paulo, Brasil). Calculou-se a concentração de flavonoides totais expressos em quercetina, usando a equação da reta. A quercetina foi usada como padrão para quantificação.

Figura 1: Amostras do extrato de *C. verum* para determinação de flavonoides totais

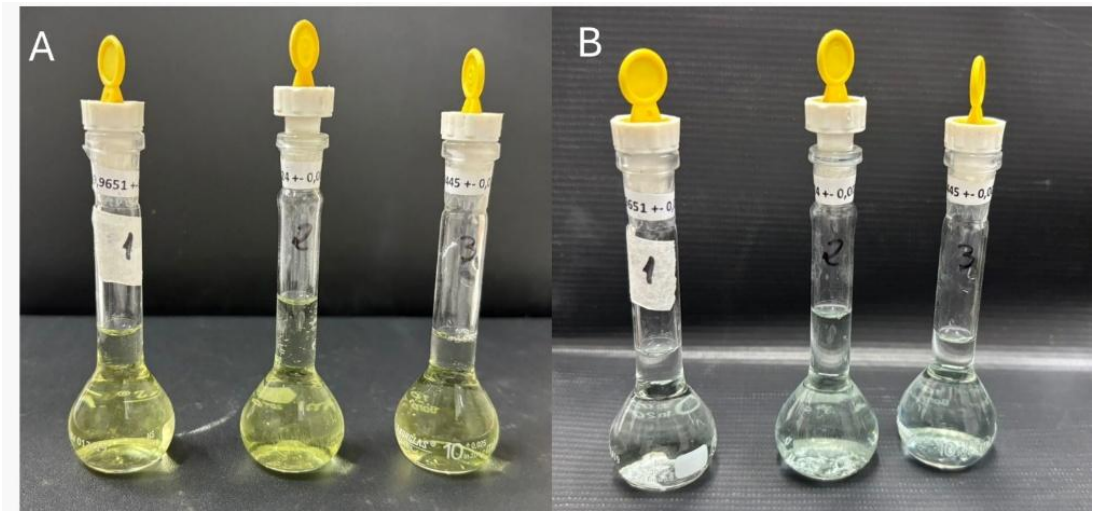


Fonte: elaborada pela autora.

4.1.4 Determinação do teor de fenóis totais

Em um balão volumétrico de 100 mL, 1 mL do extrato foi transferido e dissolvido com 5 ml de etanol (álcool etílico 99,5% - Merck Darmstadt, Alemanha) até completar o volume com água destilada (obtida em sistema Milli-Q®) lentamente e sob agitação (solução estoque) (10 μg/mL). O procedimento foi feito a partir deste ponto em triplicata. Uma alíquota de 0,2 mL (200 μL) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL (1:50) contendo aproximadamente 5 mL de água destilada com adição de 800 μL do reagente Folin – Ciocalteau (Sigma aldrich, Missouri, EUA). Agitou-se por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 minutos acrescentou-se 1,2 mL da solução de tampão carbonato-tartarato de sódio a 20%. Completou-se o volume com água até próximo ao menisco. A solução foi mantida em banho-maria (Generalmed, São Paulo, Brasil) a 20°C. Decorrido o tempo de 2 horas, realizou-se o acerto do volume final a 20°C, agitando-se por alguns segundos, com a leitura a 760 nm em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil). A concentração de fenóis totais expressos em ácido gálico foi calculada utilizando a equação da reta da curva-padrão para posterior quantificação (figura 2).

Figura 2: Amostra do extrato de *C. verum* para determinação de fenóis totais



Legenda: A- amostras para determinação de fenóis; B- amostras após 2 horas de descanso.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme

Para avaliação antimicrobiana e antibiofilme, optamos por utilizar cepa clínica de *Enterococcus faecalis*. As cepas bacterianas foram cultivadas (37°C/24 h) em ágar BHI (Brain Heart Infusion). Em seguida, foi realizado as preparações das suspensões microbianas onde colônias de cepas foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e homogeneizado em Vórtex por 10 segundos para posterior padronização da solução microbiana conforme a necessidade de cada protocolo.

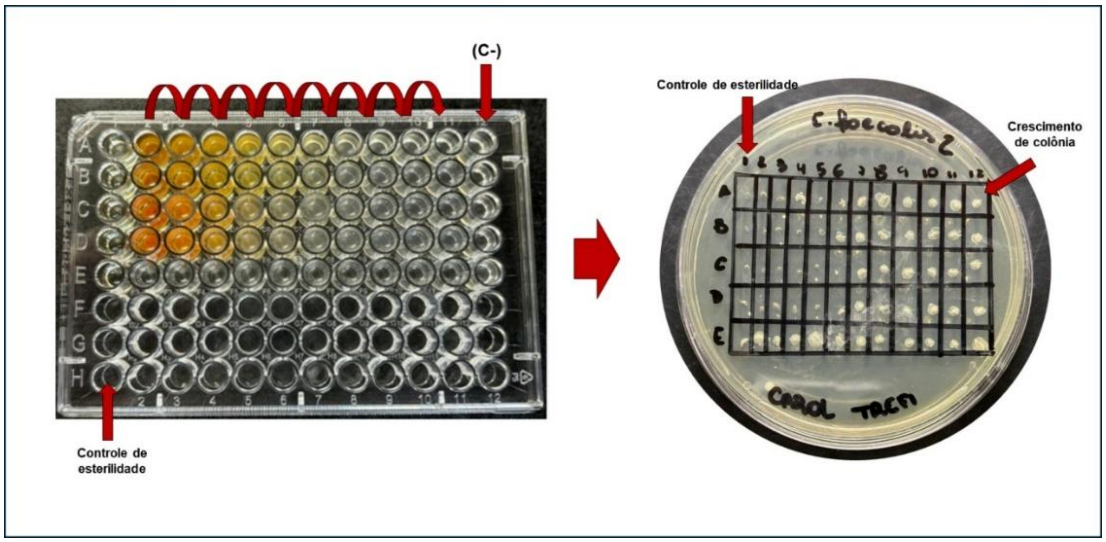
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato *Psidium guajava* L. e de *Cinnamomum verum*

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A9, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato isolado. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil). Para padronização de *E. faecalis*, foi utilizado o comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,298, resultando em uma suspensão padrão de 1 x 10^6 células bacterianas por mililitro. Em diferentes microplacas (Kasvi K12-096, São José do Pinhais, Brasil), foram realizadas 10 diluições seriadas (1:2) dos extratos em meios de cultura com caldo *Mueller Hinton* (HiMedia® Mumbai, Índia) para o teste em *E. faecalis*. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana foram adicionadas em todos os poços. Após incubação por 24 h a 37ºC, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvações que indicariam crescimento microbiano. Este teste foi realizado em triplicata.

Para que a Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos fosse determinada, uma haste de madeira estéril é mergulhada em cada poço e perfurado no ágar BHI no seu lugar correspondente e então levado para incubação a 37ºC por 48 h para posterior leitura. A CMM de cada extrato para a cepa bacteriana foi

determinada em placas sem crescimento de colônias. Um grupo tratado com o veículo (EtOH:H2O / 50:50) foi acrescido, a fim de se verificar possível interferência na atividade antibacteriana do extrato (figura 3).

Figura 3: Determinação da CIM e CMM dos extratos vegetais



Legenda: Ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM dos extratos de *C. verum* e *P. guajava* L. para posterior determinação da CMM em ágar.
Fonte: elaborada pela autora.

4.2.2 Determinação das associações dos extratos por meio do método de microdiluição *Checkerboard*

O efeito combinado dos extratos foi avaliado pela técnica *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez) para todos os microrganismos estudados, de acordo com Odds (2003), Fratini et al. (2017) e Usjak (2019). A técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo e determina o tipo de interação entre os extratos em: sinérgico, aditivo, antagônico ou indiferente. Foi utilizado como meio de cultura o caldo *Mueller Hinton* (HiMedia® Mumbai, Índia).

Para as combinações duplas dos extratos foram utilizados como referência os valores de CMM previamente obtidos. Para tanto, 50 µL de cada diluição do primeiro

extrato foram adicionadas no eixo x (horizontal) da microplaca, enquanto 50 µL das diluições do segundo extrato foram adicionadas no eixo y (vertical) da microplaca de forma que sejam associadas diferentes concentrações de ambos os extratos (Usjak eu al., 2019; Fratini et al., 2017). Em seguida, foi adicionado o inóculo microbiano, padronizado em 1 x 10^6 UFC/mL, totalizando o volume de 200 µL em cada poço, exceto no controle negativo que recebeu o caldo *Mueller Hilton*.

Foi feito o cálculo de Concentração bactericida fracionária (ICBF) em que a ICBF de cada extrato é igual a relação entre o seu valor de CMM na combinação com a sua CMM quando isolado (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh et al., 2019; Orhan et al., 2005). Uma combinação é considerada sinérgica quando a ICBF ≤0,5, aditiva quando a ICBF é >0,5 e ≤1,0, indiferente quando a ICBF >1 e ≤4 e antagonista quando a ICBF>4,0 (Odds, 2003).

Para isso, uma alíquota (10 µL) foi semeada em ágar, as placas foram incubadas por 48 h e foi determinada a ICBF de acordo com a ausência de crescimento microbiano nas placas. Todos os testes foram realizados em triplicata. Com base nos resultados dos testes de c*heckerboard*, as associações que apresentaram resultados sinérgicos ou aditivos foram utilizadas nos próximos testes.

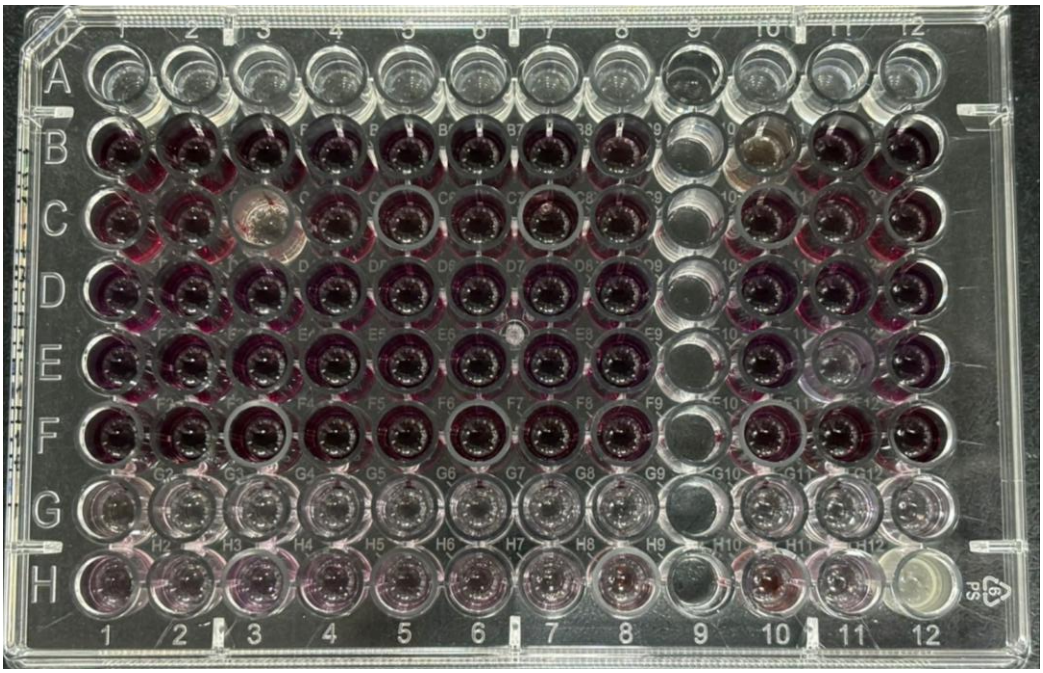
4.3 Avaliação da atividade antibiofilme dos extratos

4.3.1 Determinação da atividade antibiofilme por meio de análise de MTT

Para o estudo de biofilmes bacterianos, a análise foi baseada em Santos et al. (2020) realizado em fluxo laminar de forma asséptica em microplacas de 96 poços, foram acrescidos 100 µL/poço do caldo BHI (Brain Heart Infusion - Kasvi). Após preparo e padronização em espectrofotômetro (10^7 células/mL), a suspensão bacteriana foi adicionada nas microplacas (100 µL/poço) contendo meio de cultura, totalizando 200 µL/poço. As placas foram levadas para incubação 37º/48h para formação do biofilme, com substituição do caldo a cada 24h de incubação, totalizando 2 dias. Depois da formação do biofilme, as alíquotas foram expostos por 20 min a

diferentes concentrações do extrato vegetal que foram definidas após os resultados do teste de CMM e as combinações dos extratos. Meio de cultura foi utilizado como controle negativo e hipoclorito de sódio 2,5% como controle positivo para todas as análises sobre biofilme. Cada grupo experimental foi composto por n=8. Após exposição aos grupos experimentais, foi adicionada solução salina e foi descartada, no intuito de lavar os poços e eliminar células não aderentes que sofreram com os tratamentos. Foram realizado o teste de viabilidade celular das células microbianas no qual foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl) - 2,5- Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, Brasil) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1h. Passado o período de incubação a solução de MTT foi retirada seguido pela adição de 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37ºC por 10 minutos e colocada no Shaker sob agitação constante por 10 minutos. Em seguida foram obtidas as densidades ópticas (DO) por meio de uma leitora de microplaca em 570 nm e as DO obtidas foram convertidas em percentual de atividade metabólica (figura 4).

Figura 4: Placa de 96 poços após exposição do biofilme aos extratos

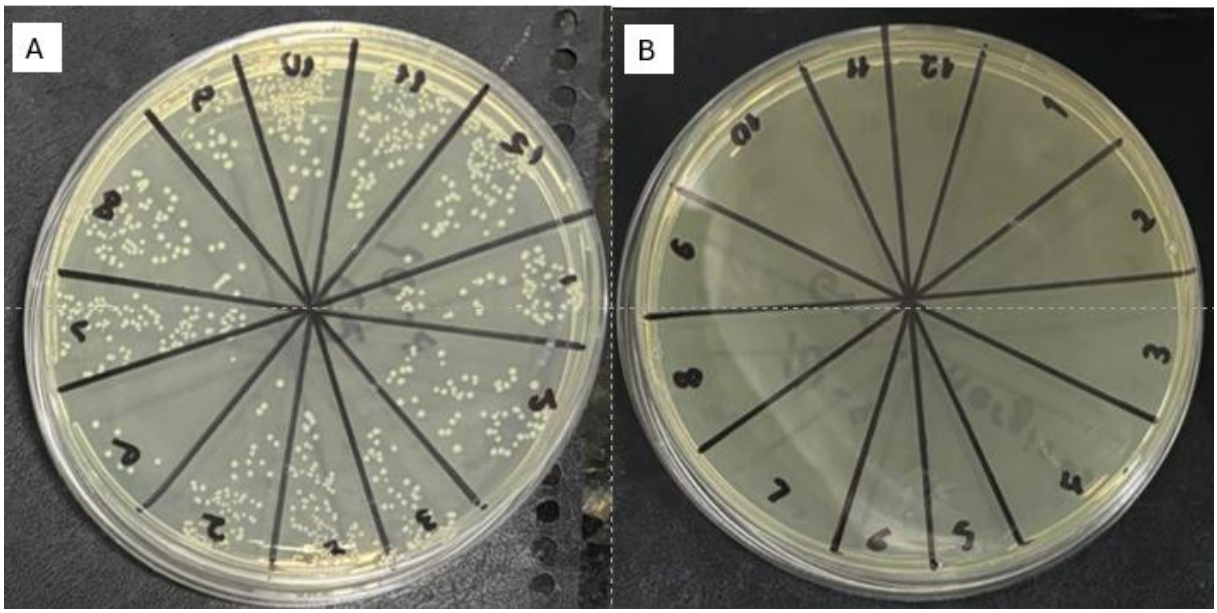


Fonte: elaborada pela autora.

4.3.2 Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

Após o período de exposição aos extratos, suas combinações e NaOCl (no tempo de 20), o biofilme de cada poço foi desagregado com auxílio do ponteira multicanal. A partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas das suspensões dos biofilmes, as quais foram semeadas em placas contendo meio de cultura seletivo M. Enterococcus Ágar (Difco, Detroit, USA) para *E. faecalis* (figura 5). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Figura 5 - Crescimento de colônias após semeadura em ágar



Legenda: Crescimento de colônias de *E. faecalis* em ágar A) Associação aditiva dos extratos de 0,16 mg/mL *C. verum* + 0,1 mg/mL *P. guajava* B) Extrato de 0,4 mg/mL *C. verum*.
Fonte: elaborada pela autora

4.4 Avaliação da atividade antibiofilme dos extratos em espécimes

4.4.1 Preparação dos espécimes

Foram utilizados 60 dentes humanos extraídos, unirradiculares e sem calcificações visíveis. Todos os dentes foram avaliados radiograficamente para confirmação da anatomia interna e assegurar que não havia reabsorções ou trincas. Estes dentes foram armazenados em solução salina estéril a 0,9% e mantidos em refrigeração a 4°C até o momento do experimento.

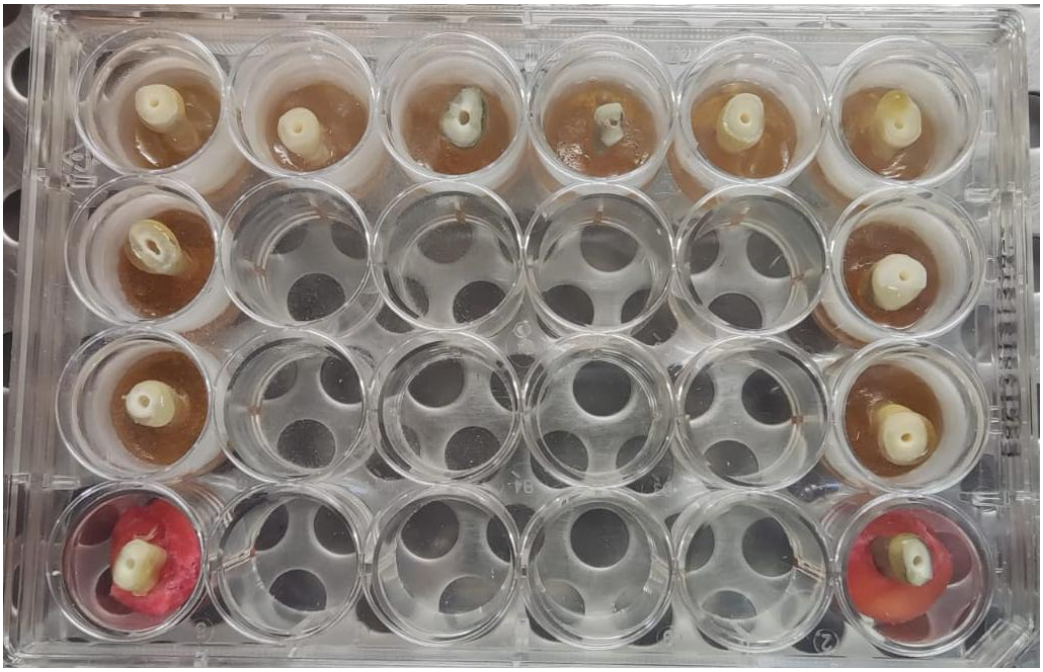
Após a seleção, as coroas dos dentes foram cortadas utilizando um disco de carburundum (Carbodent Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina), padronizando o comprimento dos espécimes para 15±0,5 mm.

Inicialmente, o canal foi explorado com uma lima 10 (Dentsply Sirona, Erlangen, Alemanha) após foram instrumentados utilizando limas Pro Taper Next® X1 e X2 (Dentsply Sirona, Erlangen, Alemanha) acopladas a um motor elétrico (X-Smart, Erlangen, Alemanha) no comprimento total do dente (0mm do forame apical), com irrigação de 5 mL de solução salina fisiológica, aplicada com seringa e agulha 30G (Navi-tips, Ultradent, Indaiatuba - SP, Brasil) a fim de aumentar o diâmetro anatômico inicial. Após o preparo inicial, os canais foram preenchidos com EDTA T (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) por 3 minutos em descanso e, em seguida, irrigados com 5 mL de solução salina fisiológica.

Posteriormente, foi realizada a vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Saint Paul, EUA), e as raízes foram impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto na região da abertura cervical.

As amostras foram distribuídas aleatoriamente em cinco placas de cultura de células de 24 poços (Costar, New York, USA) com doze espécimes em cada um e 10 espécimes foram fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil) e 2 espécimes foram fixados com cera utilidade, para posterior análise em MEV (figura 6). Todos os materiais foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) (IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, Brasil) para detoxicar endotoxinas pré existentes (Oliveira e Cardoso, 2007).

Figura 6: Amostras fixadas com resina acrílica e cera após esterilização por radiação gama cobalto 60.



Fonte: elaborada pela autora

4.4.2 Contaminação dos espécimes

O microrganismo utilizado foi cepa clínica de *Enterococcus faecalis*, que foi cultivado em placas de Petri contendo ágar seletivo, Enterococcosel ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Inicialmente, foi preparada uma suspensão com concentração de 10^7 células/mL de *E. faecalis.* Em seguida, 10 µL dessa suspensão de *E. faecalis*, e 20 µL de caldo BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) foram inoculados em cada canal radicular. Na entrada dos canais, foi colocado uma bolinha de algodão estéril apirogênico embebido em meio de cultura. As amostras foram armazenadas em estufa a 37º±1ºC, em atmosfera umidificada. O caldo BHI foi resposto a cada 48h para manter o lúmen do canal preenchido, garantindo o crescimento contínuo do *E. faecalis*.

Após 21 dias, foi realizado o preparo biomecânico de acordo com os diferentes grupos experimentais (Figura 7).

Figura 7: Preparo biomecânico



Fonte: elaborada pela autora

4.4.3 Divisão dos Grupos experimentais

As amostras foram divididas aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n=12):

- Grupo 1: Água apirogênica
- Grupo 2: Solução de NaOCl 2,5% (Asfer Industria Química - São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil)
- Grupo 3: Sinergismo do extrato de *C. verum* (0,16) e do extrato de *P. guajava* L. (0,1)
- Grupo 4: Extrato de *C. verum* isolado

- Grupo 5: Extrato de *P. guajava* isolado

4.4.4 Protocolo de Preparo Biomecânico (PBM)

Os canais foram instrumentados em toda sua extensão com limas Reciproc® R40 (VDW, Munique, Alemanha) por terços: cervical, médio e apical com o lúmen do canal inundado, ao avanço do instrumento, os espécimes eram irrigados com 1 mL totalizando uma única irrigação de 5 mL aplicada com seringa plástica e agulha de insulina (31G) com o movimento de vai-vém (figura 8), da seguinte forma:

- Grupo 1: foi realizada irrigação com 5 mL de água apirogênica por 3 minutos.
- Grupo 2: foi realizada irrigação com 5 mL de NaOCl 2,5% por 3 minutos.
- Grupo 3: foi realizada irrigação com 5 mL de Sinergismo de *C. verum* e *P. guajava* L. por 3 minutos.
- Grupo 4: foi realizado irrigação com 5 mL de extrato de *C. verum* por 3 minutos.
- Grupo 5: foi realizado irrigação com 5 mL de extrato de *P. guajava* L. por 3 minutos.

Figura 8: Preparo biomecânico com extrato de canela

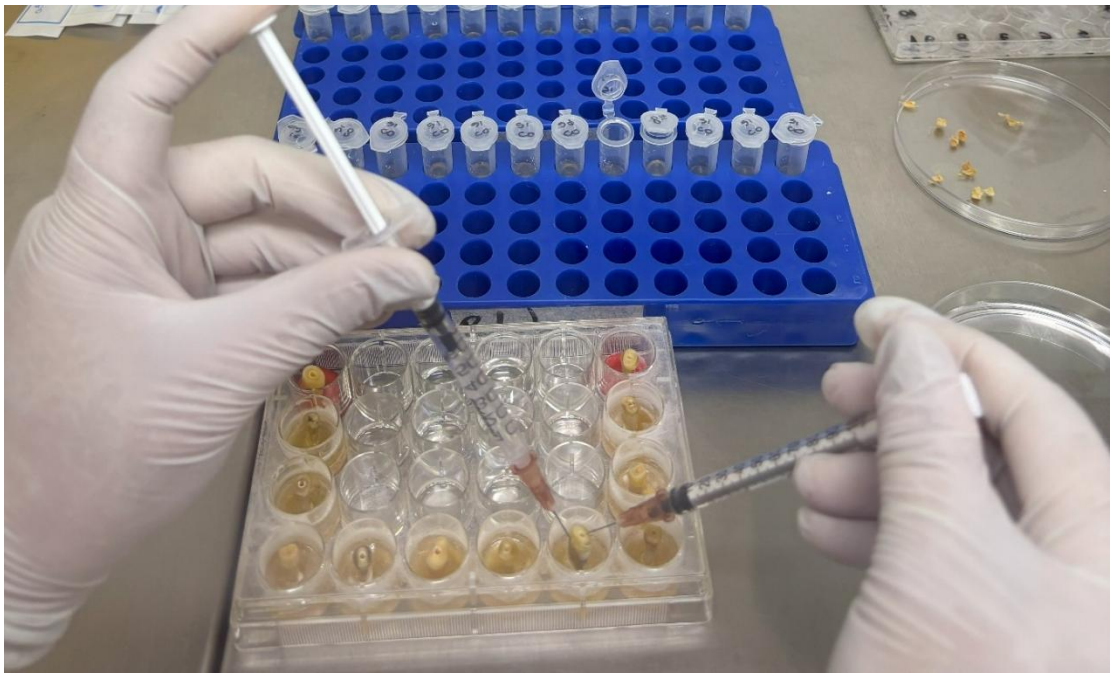


Fonte: elaborada pela autora.

4.4.5 Coletas para análise

Primeira coleta – análise microbiológica: A fim de confirmar se os espécimes foram contaminados, ao término do protocolo de contaminação de 21 dias, uma amostra inicial (S1) de confirmação foi coletada do canal radicular para servir como linha de base. Foram coletados 100 µL do conteúdo do canal radicular preenchido com água apirogênica e seringa de insulina apirogênica e foram depositadas em Eppendorfs estéreis com 900 µL de água apirogênica estéril, para posterior semeadura. Em seguida foram realizadas diluições seriadas e semeadura em duplicata (figura 9). A suspensão foi semeada em Enterococcosel ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) incubada a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para avaliar a eficácia antimicrobiana dos irrigantes.

Figura 9: Primeira coleta para análise microbiológica.

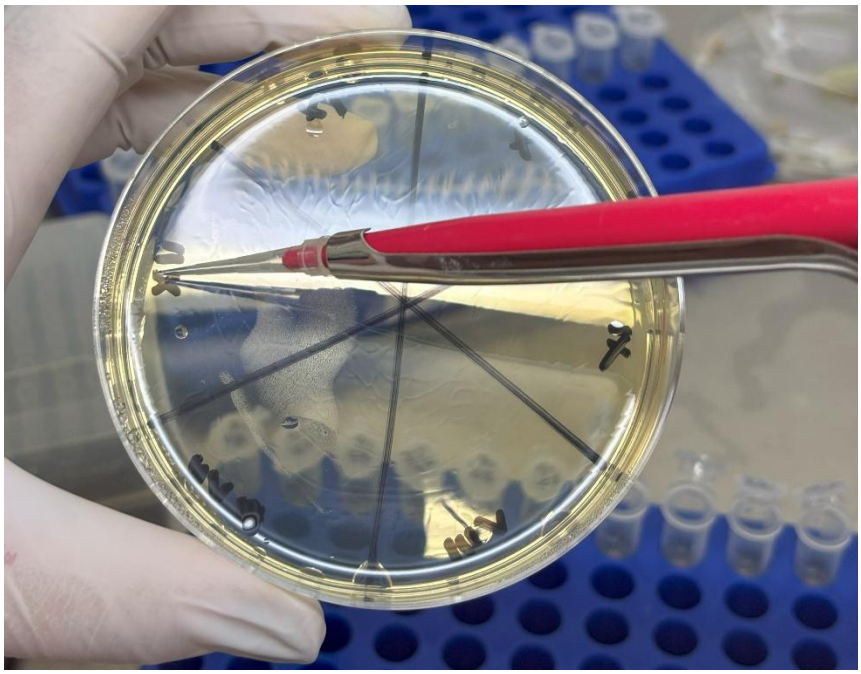


Fonte: elaborada pela autora.

Após o preparo mecânico e a irrigação, foi realizado a segunda coleta:

Segunda coleta – análise microbiológica: Após o PBM, foram coletados 100 µL do conteúdo do canal radicular preenchido com água apirogênica e seringa de insulina apirogênica e foram depositadas em Eppendorfs estéreis com 900 µL de água apirogênica, para posterior semeadura. Em seguida foram realizadas diluições seriadas e semeadura em duplicata. A suspensão foi semeada em Enterococcosel ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubada a 37°C por 24 horas (figura 10). Após esse período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para avaliar a eficácia antimicrobiana dos irrigantes.

Figura 10: Inserção da gota da suspensão bacteriana para semeadura em ágar



Fonte: elaborada pela autora.

4.4.6 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizados dois dentes de cada grupo como amostras representativas. Foram feitos dois sulcos longitudinais no longo eixo do dente, servindo como referência para a clivagem e permitindo a visualização da extensão do canal radicular.

Em seguida os espécimes foram fixados com glutaraldeído 2,5% por 1 hora e desidratados em concentrações crescentes de etanol (10%, 25%, 50%,75% e 90%), por 20 minutos em cada concentração, seguido de uma imersão em álcool isopropílico 99,9% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa (Olidef, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) até o momento da análise. Para a análise, os espécimes foram fixados em uma plataforma de alumínio (stub) usando fita de carbono condutiva de dupla face, e, em seguida, metalizados (Emitech SC7620, Quórum Technologies Ltda., Laughton, Reino Unido) com uma fina camada de liga de ouro. A MEV foi realizada com ampliações de 2000× e 4000× (Inspect S50, FEI, Brno,

República Tcheca), conforme descrito em estudos anteriores (Abu Hasna et al., 2020a; Cesario et al., 2018; Duque et al., 2017; Justo et al., 2014).

4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos que obtiverem distribuição normal serão analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey*, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Caso os dados não passem pelo teste de normalidade, serão analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de Dunn, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

5 RESULTADO

5.1 Extratos

5.1.1 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (TSS) indica a quantidade de substâncias solúveis no solvente de extração hidroetanólico (EtOH:H2O), determinando-se, dessa forma, a concentração final do extrato vegetal. Dessa forma, o TSS do extrato hidroetanólico da *C. verum* foi de 34,8 mg/mL e o TSS do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. foi de 25,7 mg/mL, descritos na Tabela 2.

Tabela 2: teor de sólidos solúveis (TSS)

Extrato/parte da planta	Solvente de extração	TSS (mg/mL)	DP
C. verum (pau)	EtOH:H_2O (50:50)	34,8	0,023
P. guajava L. (folha)	EtOH:H_2O (50:50)	25,7	0,048

Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto; H2O - água destilada; TSS - Teor de sólidos solúveis; DP - desvio padrão de três determinações.
Fonte: Elaborado pela autora.

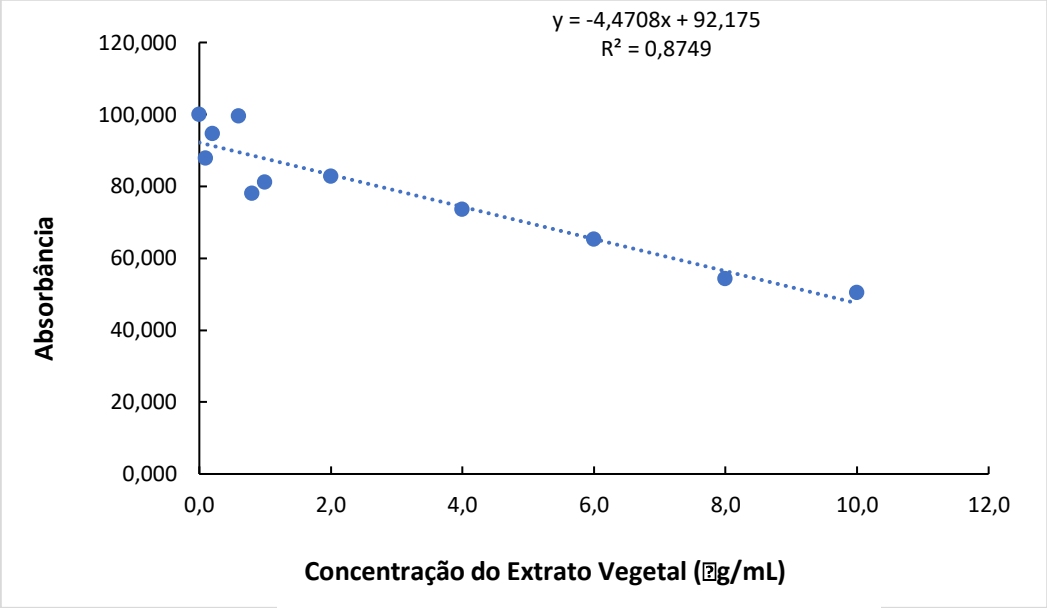
5.1.2 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante)

A concentração que elimina 50% dos radicais liberais (CE50) foi de 9,43µg/mL para o extrato de *C. verum* com desvio padrão de 2,08 µg/mL.

A concentração que elimina 50% dos radicais liberais (CE50) foi de 4,97 µg/mL para o extrato de *P. guajava* L. com desvio padrão de 1,64. µg/mL.

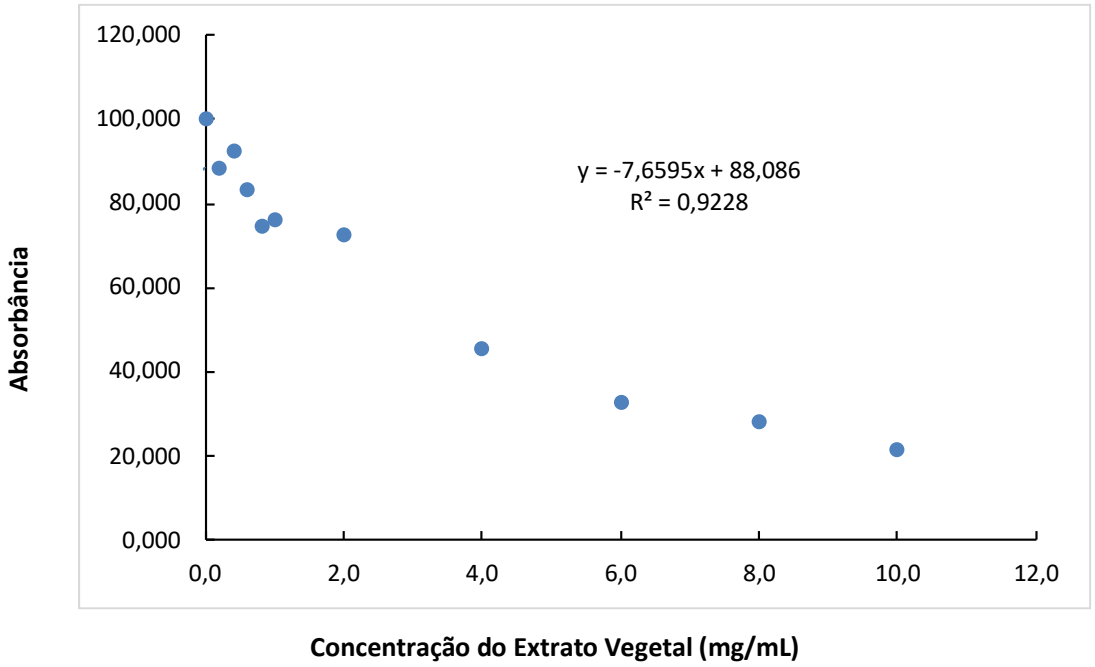
A atividade antioxidante dos extratos está demonstrada nas figuras 11 e 12 e tabela 1.

Figura 11: representação gráfica da curva da atividade antioxidante do extrato da *C. verum*



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 12: representação gráfica da curva padrão da atividade antioxidante do extrato *P. guajava* L.



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 1: avaliação da atividade antioxidante dos extratos

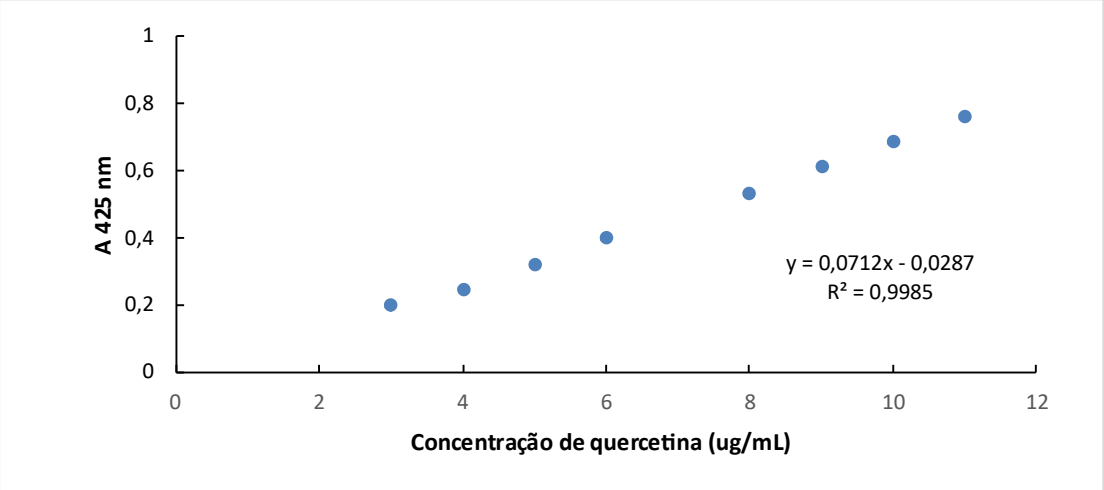
Extrato/ parte da planta	Tipo de extração	CE_{50}(mg/mL)
C. verum (pau)	EtOH:H_2O (50:50)	9,43
P. guajava L. (folha)	EtOH:H_2O (50:50)	4,97

Legenda: EtOH:H2O – hidroetanólico; CE50 - concentração que elimina 50% dos radicais livres.
Fonte: Elaborado pela autora

5.1.3 Determinação de flavonoides totais nas amostras dos extratos

A curva padrão foi elaborada a partir das diferentes concentrações de quercetina está apresentada na figura 13, representando os dados obtidos.

Figura 13: Representação gráfica da curva-padrão de Quercetina para quantificação de flavonoides dos extratos hidroetanólico.



Legenda: Curva-padrão expressa em querticina
Fonte: elaborada pela autora

A quantidade de flavonoides totais dos extratos de *C. verum* e *P. guajava* L. foram analisados a partir da curva padrão de quercetina. Os valores estão expressos na tabela 3. Para o extrato hidroetanólico de *C. verum* a concentração de flavonoides foi de 2,91 mg/mL e para o extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. foi de 4,07 mg/mL (figura 9).

Tabela 3: Teor de flavonoides totais dos extratos

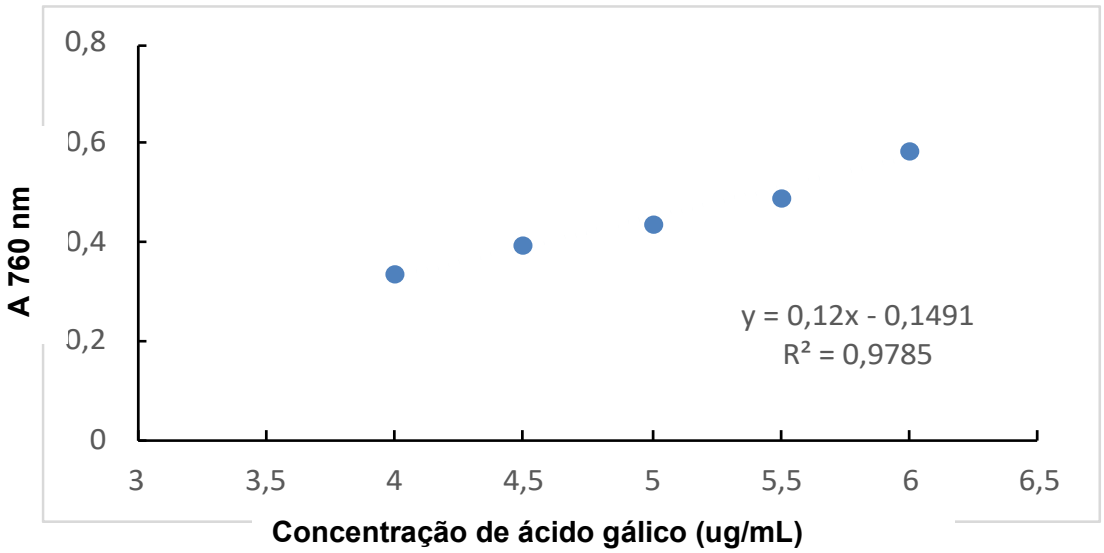
Extrato/ parte da planta	Solvente de extração	FLV (mg/mL)	DP
C. verum (pau)	EtOH:H_2O (50:50)	2,91	0,007
P. guajava L. (folha)	EtOH:H_2O (50:50)	4,07	0,026

Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto); H2O – água destilada; FLV – flavonoides totais; DP - desvio padrão de três determinações.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.4 Determinação de fenóis totais nas amostras dos extratos

A curva padrão construída com base no ácido gálico está demonstrado na figura 14.

Figura 14: Representação gráfica da curva-padrão construída com base no ácido gálico para a quantificação dos fenóis totais dos extratos hidroetanólico.



Legenda: Curva-padrão fenóis

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da curva-padrão do ácido gálico, os extratos de *C. verum* apresentam teor de fenóis total de 11,83 µg/mL e do extrato de *P. guajava* L. apresenta 24,78 µg/mL, como demostrado na tabela 4.

Tabela 4: Teor de fenóis totais dos extratos

Extrato/ parte da planta	Solvente de extração	Fenóis (mg/mL)	DP
C. verum (pau)	EtOH:H_2O	11,83	0,097
P. guajava L. (folha)	EtOH:H_2O	24,78	0,114

Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto); H2O – água destilada; FLV – flavonoides totais; DP - desvio padrão de três determinações.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em culturas planctônicas

5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos *Psidium guajava* L. e *Cinnamomum verum*

O extrato de *P. guajava* L. apresentou atividade bactericida contra a cepa clínica avaliadas de *E. faecalis*, os valores de CMM estão demonstrados na tabela 5, respectivamente. Não foi possível identificar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) devido a turbidez ocasionada pela coloração do extrato que impossibilitou a leitura visual, portanto, nesse estudo o valor de CMM foi considerado para a avaliação antibiofilme.

Tabela 5 – Concentração Microbicida Mínima (CMM) obtida pelo extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. sobre cepa de *E. faecalis*

Cepa	CMM (mg/mL)

E. faecalis	0,4

Fonte: elaborado pela autora.

O extrato de *C. verum* apresentou atividade bactericida contra as cepas avaliada de *E. faecalis,* o valor de CMM está demonstrado na tabela 6. Não foi possível identificar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) devido a turbidez ocasionada pela coloração do extrato que impossibilitou a leitura visual, portanto, nesse estudo o valor de CMM foi considerado para a avaliação antibiofilme.

Tabela 6 – Concentração Microbicida Mínima (CMM) obtida pelo extrato hidroetanólico de *C. verum* sobre cepa de *E. faecalis*

Cepa	**CMM (mg/mL)**
E. faecalis	0,2

Fonte: elaborado pela autora.

5.2.2 Ensaio de microdiluição *checkerboard* das associações dos extratos

Para determinar a associação dos extratos, realizamos o cálculo de ICBF, os extratos de *C. verum* e *P. guajava* L. apresentaram duas combinações aditivas e duas combinações indiferentes para *E. faecalis* (tabela 7).

Tabela 7 – Valores de Concentração Microbicida Mínima dos extratos de *C. verum* e *P. guajava* L. isolados e em combinações sobre *E. faecalis*

Combinação	CMM isolado (mg/ml)		Combinação		Valores ICBF	Redução da CMM		Interação
	CA	GO	CA	GO		CA	GO	
CA + GO	0,2	0,4	0,16	0,1	1,05	1,25x	4x	IND
CA + GO	0,2	0,4	0,16	0,5	0,925	1,25x	0,8x	A
CA + GO	0,2	0,4	0,16	0,2	0,85	1,25x	2x	A
CA + GO	0,2	0,4	0,4	1,3	1,275	0,5x	0,3x	IND

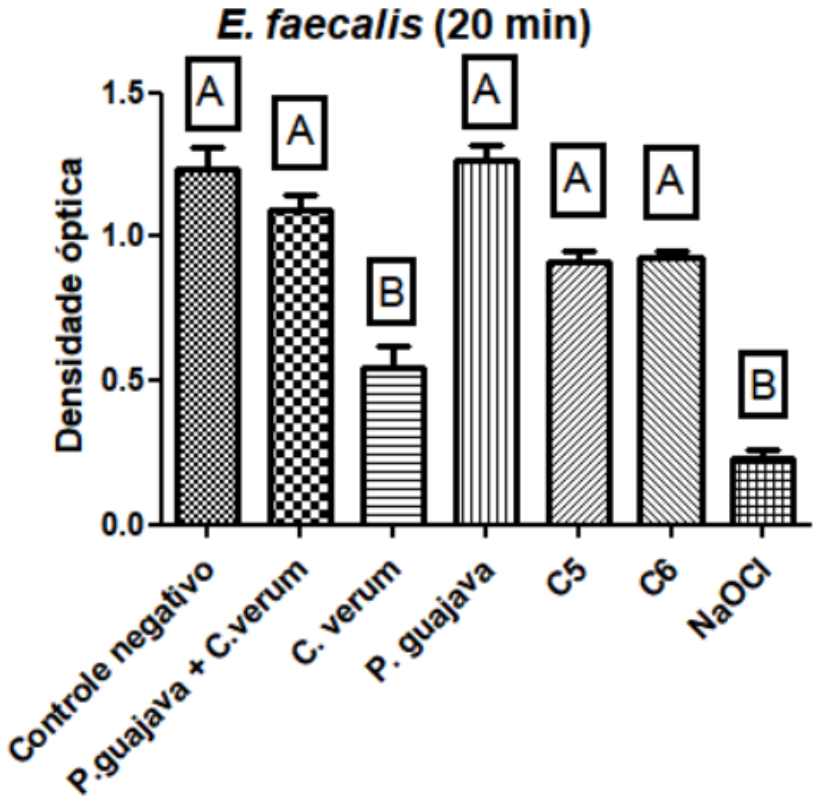
Legenda: CA: canela; GO: goiabeira; CMM: Concentração microbicida mínima, IB; A: aditiva, IND: indiferente
Fonte: Elaborada pela autora.

5.3. Avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais

5.3.1 Avaliação antibiofilme por meio de análise de MTT

Com base nos resultados obtidos dos efeitos das associações dos extratos vegetais 34,8 mg/mL *C. verum* + 25,7 mg/mL *P. guajava*, uma associação indiferente (0,16 mg/mL *C. verum* + 0,1 mg/mL *P. guajava)* e uma associação aditiva (0,16 mg/mL *C. verum* + 0,5 mg/mL *P. guajava*) foram testadas para a atividade antibiofilme, juntamente com as concentrações isoladas contra *E. faecalis* para o tempo de 20 minutos (figura 15).

Figura 15 – Aplicação do tratamento de biofilme por 20 minutos de *E. faecalis*



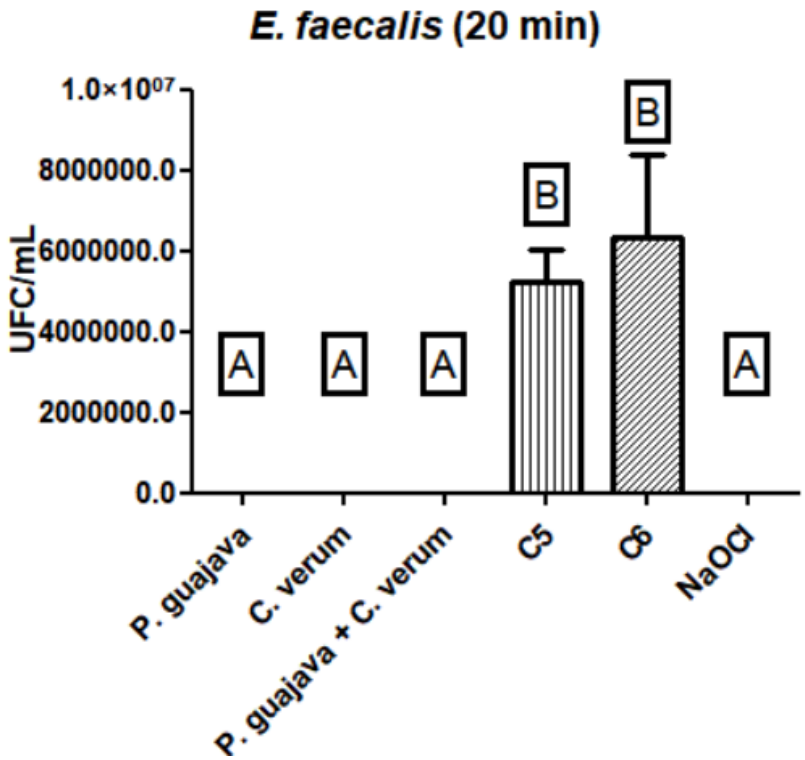
Legenda: As letras “A”, “B” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p≤0,05). Os dados não obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Dunn. C5:0,16 *C. verum* + 0,1 *P. guajava*. C6: 0,16 *C. verum* + 0,5 *P. guajava*. NaOCl: hipoclorito de sódio 2,5%
Fonte: Elaborado pela autora.

No tempo de 20 minutos, as associações de 34,8 mg/mL *P. guajava* + 25,7 mg/mL *C. verum*; 0,16 mg/mL *P. guajava* + 0,1 mg/mL *C. verum;* 0,16 mg/mL *P. guajava* + 0,5 mg/mL *C. verum* e 34,8 mg/mL *P. guajava* não apresentaram diferença estatística (figura 15) quando comparada com o grupo controle negativo. No entanto, o extrato isolado de 25,7 mg/mL *C. verum* apresentou redução de biofilme comparável estatisticamente ($p<0,05$) com o hipoclorito de sódio 2,5%.

5.3.2 Avaliação antibiofilme após plaqueamento por meio de análise de UFC/mL

Para ação dos extratos no biofilme de *E. faecalis* pode se observar que a associação dos extratos de 34,8 mg/mL *P. guajava* + 25,7 mg/mL *C. verum* e os extratos isolados de *P. guajava* L. (34,8 mg/mL) e *C. verum* (25,7 mg/mL) foram estatisticamente iguais ao grupo do hipoclorito de sódio 2,5%. Esses grupos reduziram em 100%. O tratamento de 20 minutos com associações de 0,16 mg/mL *C. verum* + 0,1 mg/mL *P. guajava* (indiferente) e 0,16 mg/mL *C. verum* + 0,5 mg/mL *P. guajava* (aditiva) não se mostraram eficientes para redução de UFC/mL do biofilme de *E. faecalis* (figura 16).

Figura 16: Aplicação dos tratamentos por 20 minutos sobre o biofilme *E. faecalis*



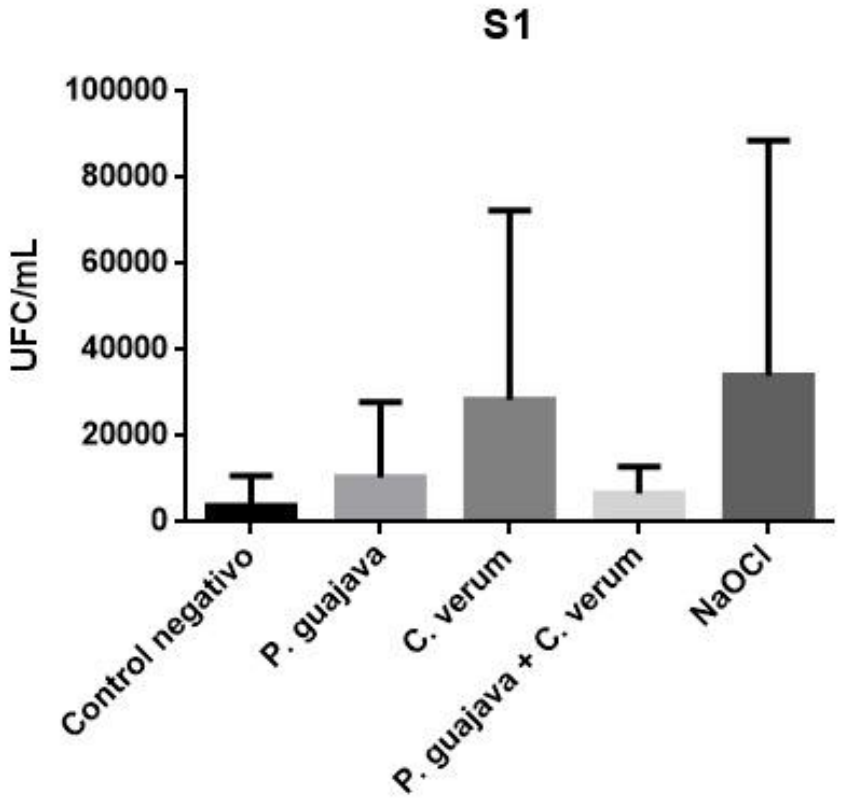
Legenda: As letras “A”, “B” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p≤0,05). Os dados não obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Dunn. C5:0,16 *C. verum* + 0,1 *P. guajava*. C6: 0,16 *C. verum* + 0,5 *P. guajava.* NaOCl: hipoclorito de sódio 2,5%
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Avaliação da atividade antibiofilme dos extratos em espécies

Com base nos resultados obtidos nos efeitos das associações dos extratos vegetais, os extratos que obtiveram ICBF aditiva, optamos pela maior concentração para testar a atividade antibiofilme, juntamente com as concentrações isoladas contra *E. faecalis*.

A fim de confirmar se os espécimes foram contaminados, ao término do protocolo de contaminação de 21 dias, uma amostra inicial (S1) de confirmação foi coletada do canal radicular para servir como linha de base (figura 17).

Figura 17: Formação de biofilme após 21 dias

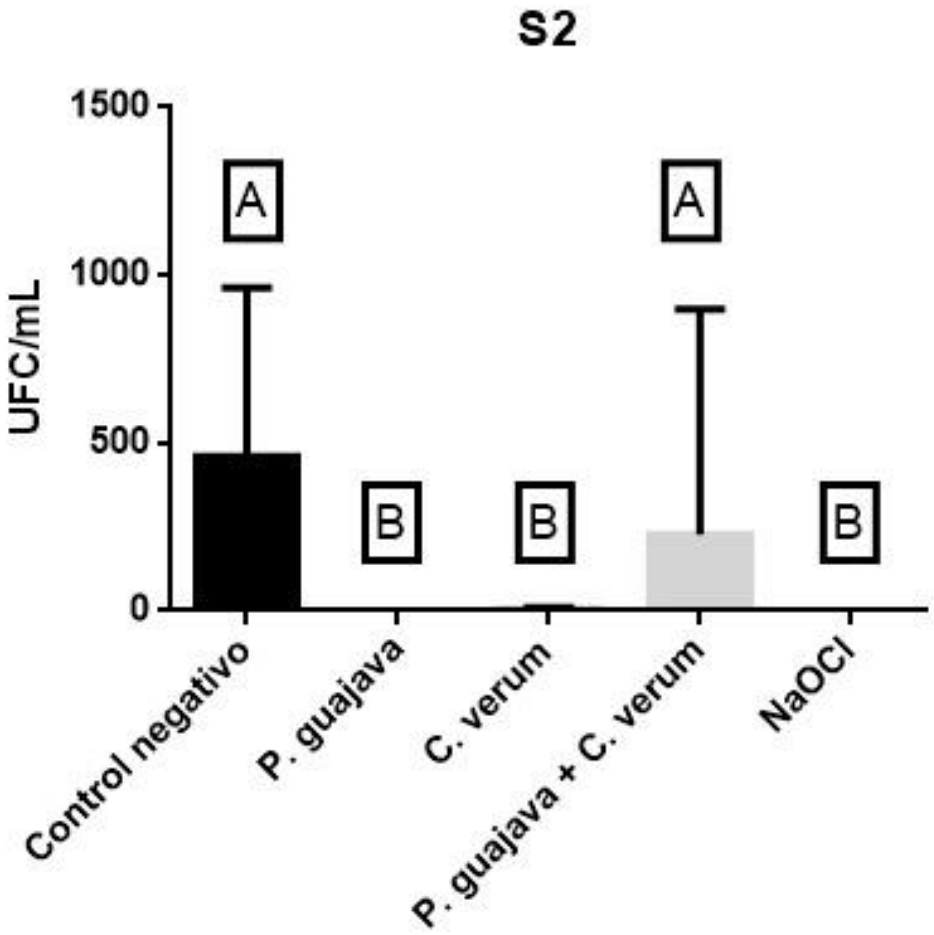


Legenda: Gráfico indicando os resultados obtidos após a formação de biofilme. NaOCl: hipoclorito de sódio.
Fonte: elaborada pela autora

Os tratamentos resultaram em: as concentrações de 0,2 mg/mL *de Psidium guajava* L. 0,4 mg/mL de *Cinnamomum verum* não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle positivo de NaOCl de 2,5%, isto é,

demostraram redução do biofilme. A combinação aditiva de 0,16 mg/mL de *Cinnamomum verum* e 0,2 mg/mL de *Psidium guajava* L. não apresentou diferença estatística entre o grupo controle positivo, como mostra na figura 18.

Figura 18: Gráfico após tratamento (PBM + irrigação)

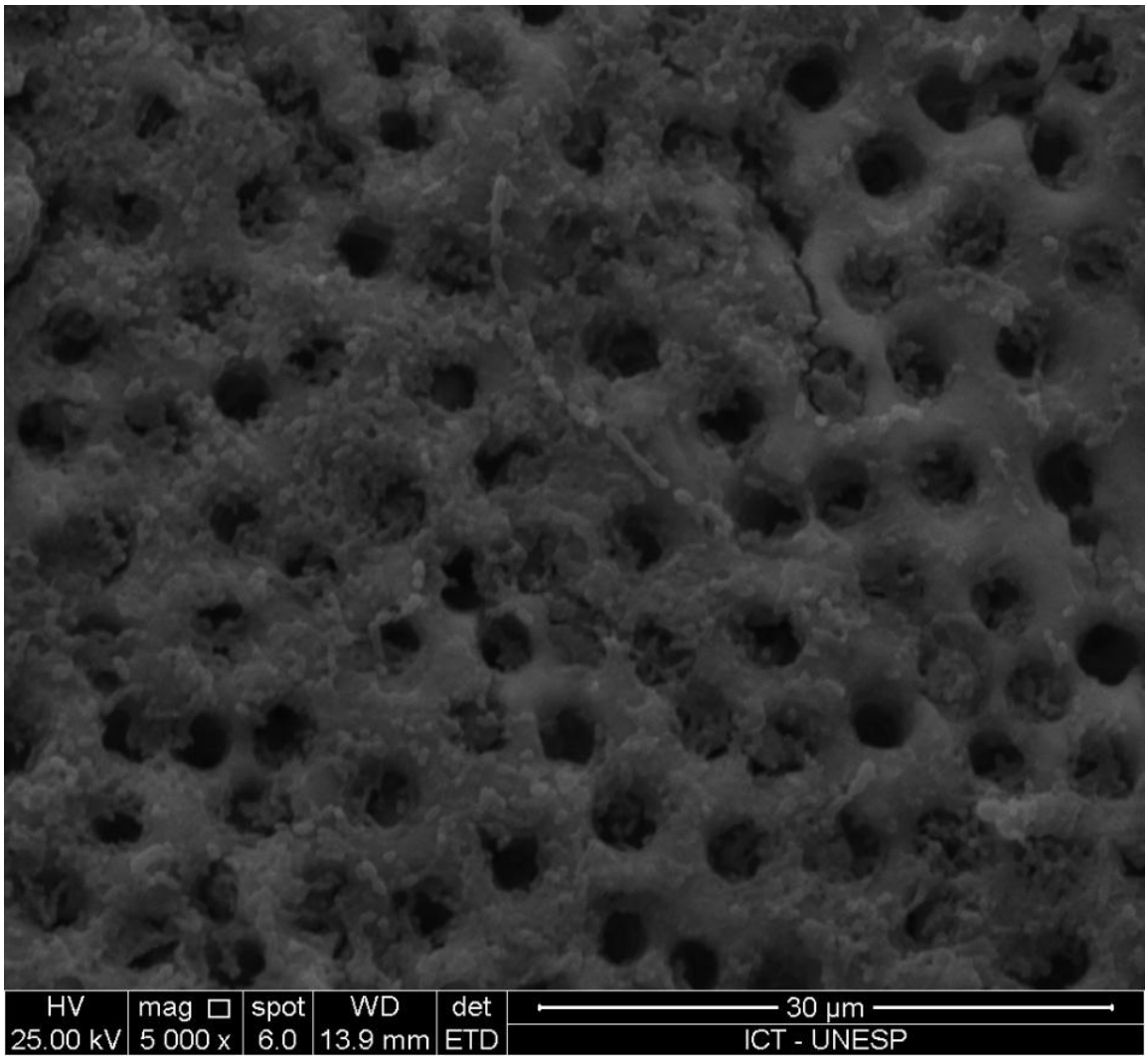


Legenda: Gráfico indicando os resultados obtidos após a formação de biofilme. NaOCl: hipoclorito de sódio.
Fonte: elaborada pela autora

5.4.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

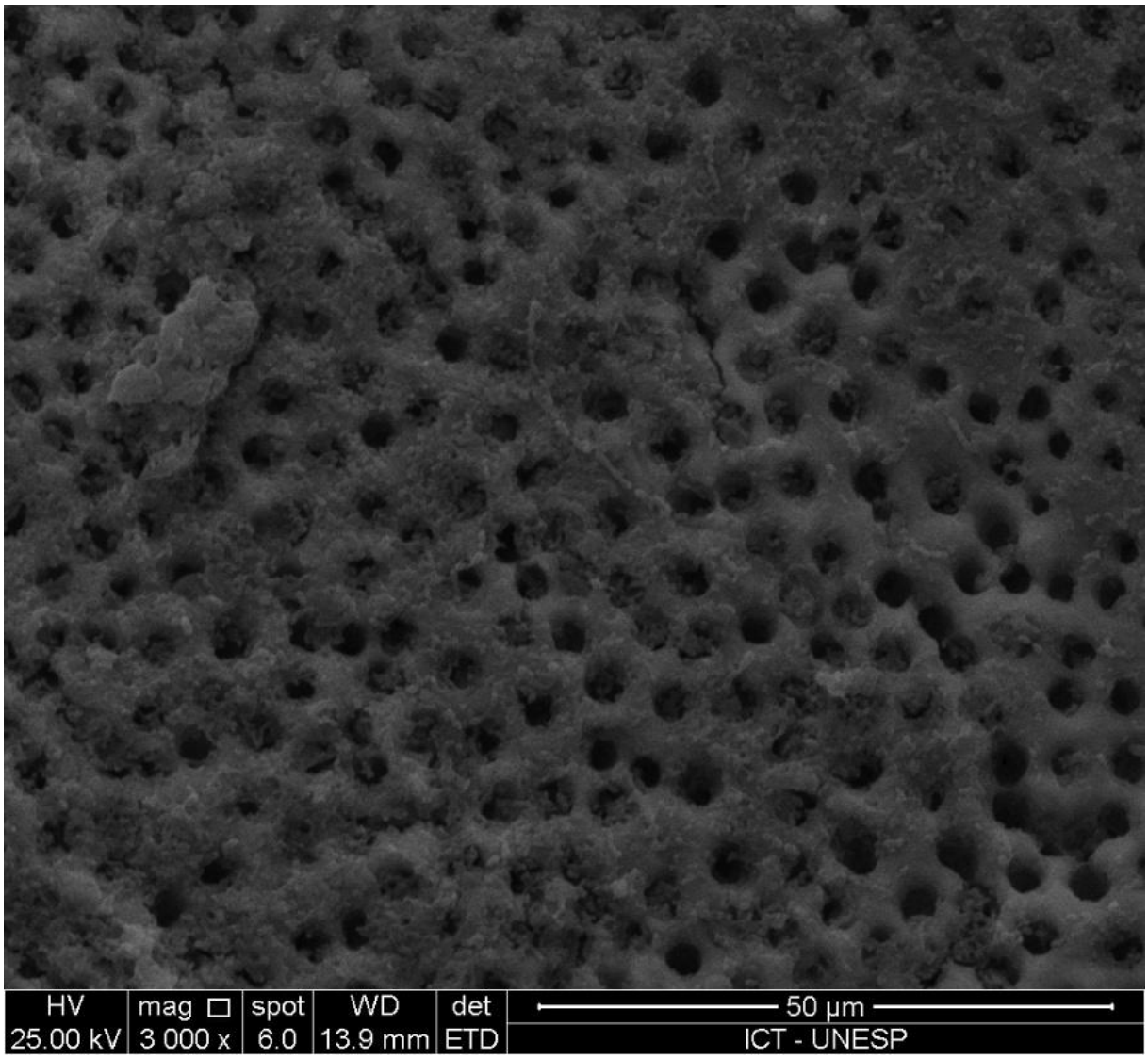
Para a microscopia eletrônica de varredura, utilizamos os dois dentes de cada grupo para confirmar a sua contaminação por *E. faecalis* e verificamos formação de biofilme com *E. faecalis* em comparação com os túbulos dentinários (figura 19 e 20)

Figura 19: Imagem por MEV 5000x *E. faecalis* após 21 dias de contaminação



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20: Imagem por MEV 3000x *E. faecalis* após 21 dias de contaminação



Fonte: elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Agentes antimicrobianos de origem vegetal têm um enorme potencial terapêutico e apresentam efeitos colaterais mais brandos quando comparados com agentes antimicrobianos sintéticos (Osonga et al., 2019; Gupta et al., 2013). Almejando a busca por alternativas ou por complementação na irrigação intracanal, este estudo avaliou os efeitos terapêuticos e antimicrobianos dos extratos hidroetanólico de *Psidium guajava* L. e *Cinnamomum verum* isolados e em associação frente a um dos principais microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas secundárias/persistentes*, Enterococcus faecalis*.

No estudo de revisão sistemática de Pinto et al. (2023), afirma que há muitos microrganismos envolvidos em infecções endodônticas persistentes, com alta prevalência dos gêneros *Enterococcus, Streptococcus, Peptostreptococcus, Prevotella, Porphyromonas, Actinomyces, Fusobacterium, Lactobacillus* e *Staphylococcus.* Esses microrganismos se organizam em biofilme polimicrobiano caracterizado por células que estão firmemente aderidas a uma superfície e imersas em uma matriz autoproduzida de substância polimérica extracelular (EPS, geralmente polissacarídeo) que funciona como uma comunidade. O biofilme é considerado um fator de virulência (Siqueira et al., 2009; Hall-Stoodley et al., 2004). As interações entre esses microrganismos tornam-se mais agressiva e resistente, sobrevivendo ou se adaptando em condições adversas (Pinto et al., 2023; Siqueira et al., 2009). Um dos principais culpados pelo fracasso endodôntico é a resistência de *Enterococcus faecalis* ao preparo biomecânico, aumentando a resistência aos antimicrobianos e persistindo o processo infeccioso (Alarcón-Sánchez et al., 2025; Barbosa – Ribeiro et al., 2020). *E. faecalis* possui a capacidade de se adapta a ambientes desfavoráveis para outros microrganismos, o que lhe proporciona uma vantagem ecológica significativa (Rocha et al., 2025).

Neste presente estudo o extrato de *Psidium guajava* L. apresentou propriedades antimicrobiana sobre cepas clínicas de *E. faecalis*, corroborando com o estudo de Carvalho et al., (2025) que verificou atividade antimicrobiana e encontrou uma concentração microbicida mínima (CMM) para as cepas de *Enterococcus faecalis* de 1,4 a 2,9 mg/mL enquanto no nosso trabalho foi encontrado uma concentração

menor 0,4mg/mL. *P. guajava* L. também demostrou atividade antibiofilme, apresentando uma contagem de unidade formadora de colônias comparável ao NaOCl após 20 minutos.

O extrato de *Cinnamomum verum* também apresentou propriedade antimicrobiana e antibiofilme sobre cepas clínicas de *E. faecalis*, até onde sabemos não há estudos na literatura científica consultada que tenha avaliado a combinação do extrato de *C. verum* e cepas clínicas de *E. faecalis*. Porém, o óleo essencial da casca de *C. verum* apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli* em concentrações baixas entre 0,02% e 0,08% (v/v) e atividade antibiofilme entre 0,02 e 0,03% (v/v) (Scotti et al., 2021). O gênero *Cinnamomum* especificamente a espécie de *zeylanicum* apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre *E. faecalis* (Gupta et al., 2013). No nosso trabalho o biofilme de *E. faecalis* reduziu em 20 minutos enquanto no trabalho de Gupta et al (2013) a inibição foi no tempo de 30 minutos.

Em relação ao resultado da ação antibiofilme dos extratos, observamos que os extratos isolados foram eficazes na exposição de 20 minutos ao biofilme de *E. faecalis (in vitro)*, tais resultados vislumbram o potencial antibiofilme dos produtos vegetais na irrigação do sistema de canais radiculares. O extrato de *P. guajava* L. e *C. verum* apresentando uma contagem de unidade formadora de colônias comparável ao NaOCl após 20 minutos. Enquanto as combinações dos extratos não se apresentaram tão eficientes hipoteticamente devido ao mesmo mecanismo de ação. A provável diferença dos resultados de MTT e UFC/mL de seu provavelmente devido a coloração do extrato.

Microrganismos localizados na região apical do sistema de canais radiculares são possivelmente as mais resistentes a terapia endodôntica envolvidos na patogênese da periodontite apical (Baasch et al., 2024). O uso de dentes humanos naturais de raízes únicas foi meticulosamente selecionado com base na sua anatomia, devido a presença de túbulos dentinários e da anatomia complexa. Outras variáveis foram padronizadas, tamanho do dente, o diâmetro inicial do canal, o diâmetro final do canal, temperatura do ambiente e do irrigante, bem como o volume e o tempo de irrigação. Além disso, uma cultura bacteriana de *E. faecalis* com cultivo de 21 dias para formação de biofilme foi utilizado para simular melhor a condição clínica. *E. faecalis* desempenha um papel importante pela persistência da infecção endodôntica e manutenção de alterações crônicas em dentes com tratamento endodôntico

(Maekawa et al., 2013). Uma vez que *E. faecalis* se aloja no interior dos túbulos dentinários, se protegendo do contato direto de agentes antimicrobianos (Gupta et al., 2013).

Os extratos de *Cinnamomum verum*, *Psidium guajava* L. e o hipoclorito de sódio promoveram redução do biofilme de *E. faecalis* quando comparados ao grupo controle com água apirogênica, que, por sua vez, apresentou semelhança estatística com o grupo tratado com a associação dos extratos. A alta redução bacteriana observada neste estudo é resultado dos efeitos mecânicos (instrumentação) e químicos (irrigação). A irrigação exerce um efeito mecânico crucial na remoção de bactérias e detritos do canal radicular (Baasch et al., 2024), no entanto, de acordo com os resultados obtidos, nossos achados divergem de estudos que afirmam ser a quantidade de irrigante que flui no canal mais relevante do que o tipo do irrigante utilizado (Lee et al., 2004; Neil et al., 1975; Baasch et al., 2024). Os efeitos químicos produzidos pelo irrigante são essenciais para alcançar a limpeza, desinfecção adequada e a redução bacteriana do sistema de canais radiculares especialmente em áreas anatômicas complexas que não podem ser tocadas mecanicamente durante os procedimentos de preparo do canal radicular (Baasch et al., 2024; Siqueira et al., 2020).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução química auxiliar (SQA) mais utilizada como irrigante durante o PBM (Iqbal, 2012; Dutner et al., 2012), isso porque apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana contra microrganismos organizados em biofilmes além da sua capacidade de dissolução de matéria orgânica (Dubey et al., 2016; de Gregório et al., 2015; Taylor, 1917; Ruksakiet et al., 2020). Podemos afirmar que a escolha do uso de antimicrobianos é fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico.

Diversos estudos testaram compostos naturais e sua ação antibacteriana contra *E. faecalis*. O óleo essencial de *Lavandula dentata* apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme contra cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* (Rocha et al., 2025). Outro estudo avaliou os extratos hidroalcoólicos de *S. officinalis* e *G. glabra*, quando combinados contra cepas clínicas e biofilme de *E. faecalis* e *E. faecium* (Santos et al., 2023). Os extratos de gengibre, canela e suas combinação apresentaram inibição da formação de colônias de *E. faecalis* que foram previamente inoculados em dentes humanos extraídos, corroborando com nosso estudo onde os

extratos de *C. verum* e *P. guajava* L. apresentaram atividade antibiofilme em modelos de dentes com zero colônias após o PBM, ou seja, 100% de ação antibacteriana (Awooda e Abdelkarim 2016). A técnica utilizada por esse estudo foi apenas o contato dos extratos sem a instrumentação, diferente do nosso estudo, no qual realizamos a instrumentação em associação com a irrigação aproximando do que seria a realidade endodôntica

Os extratos são constituídos por compostos fitoquímicos responsáveis por diferentes ações terapêuticas, antibacterianas, antifúngicas, antibiofilme e antioxidante. Os compostos responsáveis por essas propriedades são decorrentes da presença de fenóis, flavonoides, taninos, glicosídeos, antocianinas entre outros (Dubale et al., 2023). O presente estudo identificou a presença de fenóis e flavonoides totais nos extratos de *Psidium guajava* L. e *Cinnamomum verum*, como realizado no estudo de Meccatti et al., 2023. O teor de sólidos solúveis no extrato hidroetanólico de *Psidium guajava* L. e *Cinnamomum verum* foi de 34,8mg/mL e 25,7mg/mL respectivamente, servindo como base para a determinação das concentrações de flavonoides e fenólicos. O teor de flavonoides de *Psidium guajava L*. foi de 4,07mg/mL no estudo de Paiva et al (2023), apresentou teor de flavonoides para *P. guajava* 1,91 mg/mL e no estudo de Carvalho et al., (2025) apresentou 0,130 mg/mL, apesar do nosso estudo os resultados serem maiores apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. O teor de fenóis de *Psidium guajava* L. foi de 24,78mg/mL, divergindo do estudo de Carvalho et al., (2025) onde encontrou 1,170 mg/mL e do estudo de Paiva et al., (2023) que encontrou 309,81 mg/mL. O teor de flavonoides de *Cinnamomum verum* foi de 2,91 mg/mL, em um estudo demostrou que na extração etanoico do *C. verum* encontraram 205,5 GAE/g e na extração aquosa 153,5 GAE/g (Gulcin et al., 2019). Já o teor de fenóis *Cinnamomum verum* 11,83 mg/mL, no trabalho de Pagliari et al., (2023) o método de extração mostrou diferentes resultados variando ente 480,18 mg/mL e 532,12 mg/mL, pelo mesmo método de extração que utilizamos EtOH-H20 50:50 obtiveram a maior concentração.

Evidências apresentam que os polifenóis, em particular os flavonoides apresentam modulação da expressão e secreção de IL-8, demostrando atividade antinflamatória (Pagliari et al., 2023; Al-Khayri et al., 2022). De acordo com Chaves et al., (2020) todos os flavonoides são fenóis, mas nem todos os fenóis são flavonoides, isso significa que os fenóis são uma categoria mais ampla de compostos químicos,

por essa razão o teor de fenóis é maior ao teor de flavonoides. É importante padronizar essas informações fitoquímicas, pois um mesmo extrato pode apresentar diferentes quantidades de compostos químicos. Essa diferença de concentração ocorre devido ao local da coleta, a localização geográfica, condições climáticas e presença de diferentes patógeno alteram a composição fitoquímicas (Gutierrez Montiel et al., 2023).

A atividade antioxidante dos extratos vegetais está diretamente relaciona à capacidade do composto de sequestrar radicais livres (Selestino Neta et al., 2017), ou seja, são capazes de neutralizar essas moléculas instáveis que podem causar dados ao DNA celular, exercendo funções de atividade biológica, como inibir inflamação, inibir o desenvolvimento do câncer (Wang et al., 2022). *P. guajava L.* e *C. verum* apresentaram CE_{50} 4,97 mg/mL e 9,43 mg/mL, quanto menor o CE_{50} mais forte será a atividade antioxidante (Sousa et al., 2007).

Os principais compostos do extrato de *Psidium guajava* L. encontrados na literatura foram: quercetina, rutina e kaempferol (Carvalho et al., 2025). A quercetina é um importante fitoquímico pertencente ao grupo de flavonoide dos polifenóis (Nguyen et al., 2022; Osonga et al., 2019), possui atividade antioxidante (Osonga et al., 2019), atividade anti-inflamatória, neuroprotetora e atividade antimicrobiana, atualmente tem sido amplamente estudada como terapia potencial contra diferentes microrganismos patogênicos (Osonga et al., 2019). Sua atividade antimicrobiana está associada à sua solubilidade via fosforilação sequencial (Osonga et al., 2017; Hooda et al., 2020; Nguyen et al., 2022) e à interação com a membrana celular bacteriana (Cushnie et al., 2005; Nguyen e Bhattacharya et al., 2022), bactérias Gram-negativas são mais resistentes a quercetina do que as bactérias Gram-positivas (Nguyen e Bhattacharya et al., 2022). A rutina também se destaca entre os polifenóis pela sua capacidade antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória (Tian et al., 2022). Sua ação antibacteriana ocorre devido à capacidade de romper a integridade da membrana bacteriana, inibir enzimas sortase essenciais para a adesão bacteriana e alteração da expressão gênica (Ivanov et al., 2022). O kaempferol é um flavonoide pertencente ao grupo de flavonoides e tem sido utilizado base para formulações de medicamentos naturais devido a sua capacidade antitumoral e antibacteriana (He et al., 2014), a literatura não é concisa em descrever como o kaempferol atua nos microrganismos, mas a estudos apontam que esse composto apresenta atividade

antibacteriana contra *E. faecalis* (Carvalho et al., 2025; Özçelik et al., 2006; Martini et al., 2004*).* Corroborando com nosso estudo onde o potencial do extrato *de Psidium guajava* L. isolado reduziu o biofilme microbiano de *E. faecalis.*

De acordo com Mariappan et al., (2013) a análise cromatográfica revelou que os compostos majoritários do extrato da casca do *Cinnamomum verum* foram: ácido (E)-3-(2-metoxifenil) -2-propenoico, trans-cinamaldeído e cumarina. O cinamaldeído é um dos principais bioativos do grupo da casca da canela, é encontrado na forma de isômeros cis e trans a depender da geometria da ligação dupla (Chen et al., 2017), principal componente para a atividade antimicrobiana (Lopez et al., 2007) devido a perturbação do *quórum sensing* de microrganismos inibindo o crescimento patogênico (Chen et al., 2017). Outros relatos na literatura acreditam que o cinamaldeído pode destruir a superfície celular bacteriana (Kim et al., 2004).

Um estudo de metanálise evidenciou que as soluções endodônticas naturais apesar de não terem superado o NaOCl, apresentam potencial antimicrobiano contra *E. faecalis* devido à dificuldade de padronização dos estudos (Ferraz et al., 2024). Apesar dos esforços para controlar as variáveis ainda é um estudo *ex vivo* e para isso é necessário cautela para exportar o cenário clínico. Também, a coleta com microbiana com volume de água apirogênica não consegue distinguir em qual terço do canal foi amostrado.

Devido à natureza destrutiva do procedimento de amostragem, as amostras estavam disponíveis apenas para análise pós-preparo, desta forma as imagens de MEV demostram túbulos dentinários com *debris* (pós-tratamento) dificultando o encontro de microrganismos remanescentes nos túbulos dentinários, por essa razão realizamos um estudo piloto para padronizar o protocolo afim de avaliar a contaminação e formação de biofilme microbiano nos túbulos dentinários.

Este estudo é um estudo para avaliar a capacidade antimicrobiana dos extratos de *P. guajava* e *C. verum* contra *E. faecalis*. Os resultados indicam que essas alternativas têm potencial para serem usadas na endodontia como irrigantes devido à sua ação antibiofilme em dentes extraídos. Pesquisas futuras podem ser conduzidas nesta direção para confirmar suas aplicações endodônticas como irrigantes ou como medicações intracanais.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que:

a) Os extratos hidroetanólico de *Cinnamomum verum* e *Psidium guajava* L. produzidos apresentaram em sua composição flavonoide e fenóis. Esses extratos demonstram importante ação antioxidante, sendo o *P. guajava* L. com menor poder oxidativo.

b) Foram encontradas associações aditivas e indiferentes do *P. guajava* e *C. verum* sobre cepa clínica *de E. faecalis*.

c) Os extratos apresentaram ação antibacteriana em culturas planctônicas e em biofilme no período de 20 minutos.

d) Os extratos de *Psidium guajava* L e *Cinnamomum verum* apresentaram atividade antibiofilme semelhantes ao hipoclorito de sódio 2,5%, em modelos de dentes A associação dos extratos não foi eficiente para redução do biofilme de *E. faecalis*.

Os extratos de *C. verum* e *P. guajava* são promissores para serem inseridos em novas formulações de irrigantes antimicrobianos na endodontia, no entanto são necessários mais estudos.

REFERÊNCIAS

Abbaszadegan A; Dadolahi S; Gholami A; Moein MR; Hamedani S; Ghasemi Y; Abbott PV; Patil S. Antimicrobial and cytotoxic activity of Cinnamomum zeylanicum, Calcium hydroxide, and triple antibiotic paste as roots canal dressing materials. J. Contemp. Dent. Pract. 2016, 17, 105–113.

Abu Hasna A, Khoury RD, Toia CC, Gonçalves GB, de Andrade FB, Talge Carvalho CA, Ribeiro Camargo CH, Carneiro Valera M. *In vitro* Evaluation of the Antimicrobial Effect of N-acetylcysteine and Photodynamic Therapy on Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*. *Iranian endodontic journal*, 2020a; *15*(4), 236–245. https://doi.org/10.22037/iej.v15i4.26865.

Abu Hasna A, Pereira Santos D, Gavlik de Oliveira TR, Pinto ABA, Pucci CR, Lage-Marques JL. Apicoectomy of Perforated Root Canal Using Bioceramic Cement and Photodynamic Therapy. Int J Dent. 2020b Dec 9; 6677588. doi: 10.1155/2020/6677588. PMID: 33376491; PMCID: PMC7746471.

Alarcón-Sánchez MA, Rodríguez-Montaño R, Becerra-Ruiz JS, Lomelí-Martínez SM, Mosaddad SA, Heboyan A. Detection of Enterococcus faecalis and the red complex bacteria analyzed by the Checkerboard technique for DNA-DNA hybridization in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2025 Mar;111(3):116654. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116654. Epub 2024 Dec 9. PMID: 39689402.

Alghamdi F, Shakir M. The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. Cureus. 2020 Mar 13;12(3):e7257. doi: 10.7759/cureus.7257. PMID: 32292671; PMCID: PMC7152576.

Al-Khayri J.M., Sahana G.R., Nagella P., Joseph B.V., Alessa F.M., Al-Mssallem M.Q. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. Molecules. 2022;27:2901. doi: 10.3390/molecules27092901.

Andrade A de O, Scelza MFZ, Pinto S de S, Guaraldi AL de M, Hirata Júnior R. Isolamento e identificação de enterococcus sp em infecções endodônticas primárias. Rev Bras Odontol. 2011;68(1):20–4. doi: 10.18363/rbo. v68n1. p.20.

Arévalo-Marín E, Casas A, Landrum L, Shock MP, Alvarado-Sizzo H, Ruiz-Sanchez E, Clement CR. The Taming of *Psidium guajava*: Natural and Cultural History of a Neotropical Fruit. Front Plant Sci. 2021 Sep 28; 12:714763. doi: 10.3389/fpls.2021.714763. PMID: 34650576; PMCID: PMC8505677.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod. 2009; May; 35(5):711-714. doi:10.1016/j.joen.2009.01.018

Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr. Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. J Endod 2013; Sep; 39:1179–84. doi:10.1016/j.joen.2013.04.036

Awooda E, Abdelkarim S. The effect of herbal medicine against Enterococcus faecalis on infected root Canal substrate: an Ex-vivo study. Eur J Med Plants. 2016; Dec; 17:1–10. https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/25915.

Baasch A, Campello AF, Rodrigues RCV, Alves FRF, Voigt DD, Mdala I, Perez R, Brasil SC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Effects of the Irrigation Needle Design on Root Canal Disinfection and Cleaning. J Endod. 2024 Oct;50(10):1463-1471. doi: 10.1016/j.joen.2024.07.006. PMID: 39029891.

Babeer A, Bukhari S, Alrehaili R, Karabucak B, Koo H. Microrobotics in endodontics: A perspective. International Endodontic Journal. 2024 57, 861–871. https://doi.org/10.1111/iej.14082

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz C, Gomes BP. Microbiological Investigation in Teeth with Persistent/Secondary Endodontic Infection in Different Stages of Root Canal Retreatment. Eur Endod J. 2020 Dec;5(3):219-225. doi: 10.14744/eej.2020.73626. PMID: 33353920; PMCID: PMC7881382.

Barrera SD, Cepeda LJB, Báez DAD, Kwon J, Siddiq A, Parra JEC, Marya A, Chaurasia A. Herbal extracts in orofacial pain: a systematic review and direct and indirect meta-analysis. Sci Rep. 2024 Nov 29;14(1):29656. doi: 10.1038/s41598-024-77796-7. PMID: 39609444; PMCID: PMC11604759.

Begum S, Hassan SI, Siddiqui BS, Shaheen F, Ghayur MN, Gilani AH. Triperpenoids from the leaves from Psidium guajava. Phytochemistry. 2002; Oct; 61 (4) :399–403. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00190-5.

Boessler C, Peters OA, Zehnder M. Impact of lubricant parameters on rotary instrument torque and force. Journal of Endodontics, 2007; Mar; 33, 280–283. Doi: 10.1016/j.joen.2006.11.007

Boutsioukis C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions - irrigants and irrigation methods. Int Endod J. 2022 May;55 Suppl 3(Suppl 3):588-612. doi: 10.1111/iej.13739. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35338652; PMCID: PMC9321999.

Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. Biomed Res Int. 2023 Jan 13; 2023:8858283. doi: 10.1155/2023/8858283. PMID: 36685672; PMCID: PMC9859704.

Carvalho LS, Meccatti-Domiciano VM, da Silva LRD, Marcucci MC, Carvalho CAT, Abu Hasna A, de Oliveira LD. *Psidium guajava* L. hydroethanolic extract as endodontic irrigant: phytochemical analysis, antioxidant activity, antimicrobial action and biocompatibility. *PeerJ*; 2025;*13*, e19301. https://doi.org/10.7717/peerj.19301

Cavalcanti YW; Pérez ALAL; Xavier GDR; de Almeida LdFD. Inhibitory effect of essential oils against organisms from root canal. Rev. Odontol. UNESP 2011, 40, 208–214

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FG da R, Alves MC, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary

Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. J Endod. 2017;43(8):1237–45. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. PMID: 28606669.

Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Lee KY. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of Sophora flavescens. J Microbiol Biotechnol.2007;17(5):858-864.

Chávez de Paz LE, Hamilton IR, Svensäter G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. Microbiology (Reading), 2008 154, 1927–1938.

Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod. 2007 Jun;33(6):652-62. doi: 10.1016/j.joen.2006.11.004. Epub 2007 Mar 23. Erratum in: J Endod. 2007 Nov;33(11):1289. Chávez de Paz, Luis [corrected to Chavez de Paz, Luis E]. PMID: 17509401.

Cheruiyot KR, Olila D, Kateregga J. In-vitro antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya. Afr Health Sci. 2009 Aug 1;9 Suppl 1(Suppl 1):S42-6. PMID: 20589160; PMCID: PMC2890996.

Cotter MR, Panzarino J. Intentional replantation: a case report. J Endod. 2006; Jun; 32(6):579-582. doi:10.1016/j.joen.2005.08.004.

Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005 Nov;26(5):343-56. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002. Erratum in: Int J Antimicrob Agents. 2006 Feb;27(2):181. PMID: 16323269; PMCID: PMC7127073.

Dubale S, Kebebe D, Zeynudin A, Abdissa N, Suleman S. Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of selected medicinal plants in Ethiopia. J Exp Pharmacol. 2023 Feb 8; 15:51-62. doi: 10.2147/JEP.S379805. PMID: 36789235; PMCID: PMC9922502

Dubey S. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Emblica officinalis, Psidium guajava), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis: An in vitro study. J Oral Biol Craniofac Res. 2016 Jan-Apr;6(1):45-8. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.010. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26937369; PMCID: PMC4756078.

Dutner J, Mines P, Anderson A. Irrigation trends among American Association of Endodontists members: a web-based survey. J Endod. 2012 Jan;38(1):37-40. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.013. Epub 2011 Sep 21. PMID: 22152617.

Elashiry MM, Bergeron BE, Tay FR. Enterococcus faecalis in secondary apical periodontitis: Mechanisms of bacterial survival and disease persistence. Microb Pathog. 2023 Oct; 183:106337. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106337. Epub 2023 Sep 6. PMID: 37683835.

Ferraz DC; Melo AP; Matos FS; Paranhos LR; Moura CC; Blumenberg C; Gurreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Antimicrobial efficacy of natural-based endodontic solutions: a systematic review with a network meta-analysis. Brazilian oral research, v. 38, p. e093, 2024.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. J Endod. 2015;41(6):824–30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031. PMID: 25892513.

Francisco PA, Delboni MG, Lima AR, Xiao Y, Siqueira WL, Gomes BPFA. Proteomic profile of root canal contents in teeth with post-treatment endodontic disease. Int Endod J. 2019;52(4):451–60. doi: 10.1111/iej.13021.

Fratini F, Mancini S, Turchi B, et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case Origanum vulgare L. and Leptospermum scoparium J. R. et G. Forst essential oils against Staphylococcus aureus strains. Microbiol Res. 2017; 195:11-17. doi:10.1016/j.micres.2016.11.005

Friedman S. Prognosis of healing in treated teeth with endodontic infections. In: Fouad AF, editor. Endodontic Microbiology. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley & Sons; 2017. p. 341–84.

Godoi-Jr EP, Bronzato JD, Francisco PA, Bícego-Pereira EC, Lopes EM Passini MRZ, de-Jesus-Soares A, Almeida JFA, Marciano MA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Microbiological profile of root canals indicated for endodontic retreatment due to secondary endodontic infections or for prosthetic reasons. Clin Oral Investig. 2023 May;27(5):2049-2064. doi: 10.1007/s00784-023-04947-x. Epub 2023 Mar 31. PMID: 37002440.

Gregorio C, Arias A, Navarrete N, Cisneros R, Cohenca N. Differences in disinfection protocols for root canal treatments between general dentists and endodontists: A Web-based survey. J Am Dent Assoc. 2015 Jul;146(7):536-43. doi: 10.1016/j.adaj.2015.01.027. PMID: 26113101.

Gulcin I, Kaya R, Goren AC, Akincioglu H, Topal M, Bingol Z, et al. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (cinnamomum verum) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. International Journal of Food Properties; 2019; Aug 22(1), 1511–1526. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1656232

Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU. Antibacterial effect of chlorhexidine-cetrimide combination, Salvia officinalis plant extract and octenidine in comparison with conventional endodontic irrigants. Dental Materials Journal. 2016. 35(5), 736–741.doi:10.4012/dmj.2015-159

Gupta A, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Yadav A, Singh G, Juneja R, Saini H. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of Syzygium aromaticum, Ocimum sanctum and Cinnamomum zeylanicum plant extracts against Enterococcus faecalis: a preliminary study. Int Endod J. 2013 Aug;46(8):775-83. doi: 10.1111/iej.12058. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23506110.

Gutierrez Montiel D, Guerrero Barrera AL, Martínez Ávila GCG, Gonzalez Hernandez MD, Chavez Vela NA, Avelar Gonzalez FJ, Ramírez Castillo FY. Influence of the Extraction Method on the Polyphenolic Profile and the Antioxidant Activity of *Psidium guajava* L. Leaf Extracts. Molecules. 2023 Dec 22;29(1):85. doi: 10.3390/molecules29010085. PMID: 38202668; PMCID: PMC10779645.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):95-108. doi: 10.1038/nrmicro821. PMID: 15040259.

He M, Wu T, Pan S, Xu X. Antimicrobial mechanism of flavonoids against Escherichia coli ATCC 25922 by model membrane study. Appl. Surf. Sci. 2014; Jun 305:515–521. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.03.125.

Hong SW, Baik JE, Kang SS, Kum KY, Yun CH, Han SH. Sodium Hypochlorite Inactivates Lipoteichoic Acid of Enterococcus faecalis by Deacylation. J Endod. 2016 Oct;42(10):1503-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.018. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27520407.

Hooda H; Singh P; Bajpai S. Effect of quercetin impregnated silver nanoparticle on growth of some clinical pathogens. Mater. Today Proc.2020 Apr,31, 625–630. doi:10.1016/j.matpr.2020.03.530

Hülsmann M, Peters OA, Dummer PM. Mechanical preparation of root canals: Shaping goals, techniques and means. Endod Top. 2005; Aug; 10:30–76. https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2005.00152.x

Iqbal A. Antimicrobial Irrigants in the Endodontic Therapy. Int J Health Sci (Qassim). 2012;6(2):1–7. doi: 10.12816/0005998. PMID: 23580897.

Irshad A, Jawad R, Mushtaq Q, Spalletta A, Martin P, Ishtiaq U. Determination of antibacterial and antioxidant potential of organic crude extracts from Malus domestica, Cinnamomum verum and Trachyspermum ammi. Sci Rep. 2025 Jan 6;15(1):976. doi: 10.1038/s41598-024-83506-0. PMID: 39762362; PMCID: PMC11704246.

Ivanov M, Novović K, Malešević M, Dinić M, Stojković D, Jovčić B, Soković M. Polyphenols as Inhibitors of Antibiotic Resistant Bacteria-Mechanisms Underlying Rutin Interference with Bacterial Virulence. Pharmaceuticals (Basel). 2022 Mar 21;15(3):385. doi: 10.3390/ph15030385. PMID: 35337182; PMCID: PMC8952364.

Jain P; Ranjan M. Role of herbs in root canal irrigation—A review. IOSR J. Pharm. Biol. Sci.2014, Mar-Apr; 9, 6–10. Doi: 10.9790/3008-09260610

Jhamb S, Singla R, Kaur A, Sharma J, Bhushan J. An in vitro determination of antibacterial effect of silver nanoparticles gel as an intracanal medicament in combination with other medicaments against Enterococcus fecalis . J Conserv Dent. 2019;22:479–82. doi: 10.4103/JCD.JCD_113_20.

Karobari MI, Adil AH, Assiry AA, Basheer SN, Noorani TY, Pawar AM, Marya A, Messina P, Scardina GA. Herbal Medications in Endodontics and Its Application-A Review of Literature. Materials (Basel). 2022a, Apr 25;15(9):3111. doi: 10.3390/ma15093111. PMID: 35591443; PMCID: PMC9101381.

Karobari MI, Arshad S, Noorani TY, Ahmed N, Basheer SN, Peeran SW, Marya A, Marya CM, Messina P, Scardina GA. Root and Root Canal Configuration Characterization Using Microcomputed Tomography: A Systematic Review. J Clin Med. 2022b Apr 20;11(9):2287. doi: 10.3390/jcm11092287. PMID: 35566414; PMCID: PMC9099997.

Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Genay Ö, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against enterococcus faecalis in infected dentinal tubules. J Endod. 2011;37(3):376–81. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.024. PMID: 21329825.

Khoury RD, Abu Hasna A, Gagliardi CF, Marinho RMM, Carvalho CAT, Bresciani E, Valera MC. Antimicrobial and anti-endotoxin activity of N-acetylcysteine, calcium hydroxide and their combination Against *Enterococcus faecalis, Escherichia coli* and lipopolysaccharides. *PeerJ*, 2024, *12*, e18331. https://doi.org/10.7717/peerj.18331

Kim HO, Park SW, Park HD. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from Cinnamomum cassia shoot. Food Microbiology 2004; 21, 105–10. Doi: https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.32115

Kumar A, Kaushik M, Mehra N, Verma N, Rathore T. Influence of apical diameter and instrument taper on apical debris extrusion during root canal instrumentation: An in vitro study. J Conserv Dent Endod. 2025;28:279–84. doi: 10.4103/JCDE.JCDE_14_25

Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. Int Endod J. 2004 Oct;37(10):672-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00848. x. PMID: 15347291.

Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Apr;45(4):999-1007. PMID: 11257008; PMCID: PMC90417. doi: 10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001.

Lima LB, Viturino da Silva WA, Silva SL, Felipe Dos Santos EC, Barbosa Machado JC, Procópio TF, de Moura MC, Napoleão TH, Assunção Ferreira MR, Soares LAL. Chemical and antibacterial analysis of Cinnamomum verum leaves extract and fractions against multidrug resistant bacteria. Nat Prod Res. 2022 May;36(10):2559-2564. doi: 10.1080/14786419.2021.1902323. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33749459.

Lins RX, De Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MAO, Williams DW, et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of Enterococcus faecalis from primary endodontic infections. J Dent. 2013;41(9):779–86. doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.004. PMID: 23851130.

Lins RX, Hirata R, Wilson M, O Lewis MA, Fidel RAS, Williams D. Comparison of genotypes, antimicrobial resistance and virulence profiles of oral and non oral Enterococcus faecalis from Brazil, Japan and the United Kingdom. J Dent. 2019; 84:49–54. doi: 10.1016/j.jdent.2019.03.002. PMID: 30862557.

Liyanage TD, Madhujith T, Wijesinghe KG. Comparative study on major chemical constituents in volatile oil of true cinnamon (Cinnamomum verum Presl. syn. C. zeylanicum Blum.) and five wild cinnamon species grown in Sri Lanka. Tropical agricultural research, 2017, 28, 270.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. Effect of Zingiber officinale and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. J Appl Oral Sci. 2013 Jan-Feb;21(1):25-31. doi: 10.1590/1678-7757201302129. PMID: 23559108; PMCID: PMC3881809.77

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. Journal of applied oral science : revista FOB. 2011; Apr; 19(2), 106–112. https://doi.org/10.1590/s1678-77572011000200005

Majhi R, Maharjan R, Shrestha M, Mali A, Basnet A, Baral M, Duwal R, Manandhar R, Rajbhandari P. Effect of altitude and solvent on Psidium guajava Linn. leaves extracts: phytochemical analysis, antioxidant, cytotoxicity and antimicrobial activity against food spoilage microbes. BMC Chem. 2023 Apr 13;17(1):36. doi: 10.1186/s13065-023-00948-9. PMID: 37055840; PMCID: PMC10100324.

Manthena S, Ramesh A, Srikanth A, Ramoji Rao MV, Preethi PL, Samatha YP. Comparative evaluation of subgingivally delivered chlorhexidine varnish and chlorhexidine gel in reducing microbial count after mechanical periodontal therapy. J Basic Clin Pharm. 2014 Dec;6(1):24-8. doi: 10.4103/0976-0105.145775. PMID: 25538468; PMCID: PMC4268626.

Martini ND, Katerere DR, Eloff JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from Combretum erythrophyllum (Combretaceae) J. Ethnopharmacol. 2004; 93:207–212. doi: 10.1016/j.jep.2004.02.030.

Meccatti VM, Martins KMC, Ramos LP, Pereira TC, de Menezes RT, Marcucci MC, Abu Hasna A, de Oliveira LD. Synergistic Antibiofilm Action of Cinnamomum verum and Brazilian Green Propolis Hydroethanolic Extracts against Multidrug-Resistant Strains of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa and Their Biocompatibility on Human Keratinocytes. Molecules. 2023 Oct 1;28(19):6904. doi: 10.3390/molecules28196904. PMID: 37836747; PMCID: PMC10574440.

Mickel AK, Chogle S, Liddle J, Huffaker K, Jones JJ. The role of apical size determination and enlargement in the reduction of intracanal bacteria. *J Endod*. 2007;33(1):21-23. doi:10.1016/j.joen.2006.08.004

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. J Endod. 2014;40(7):899–906. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.010. PMID: 24935532.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990 Dec;16(12):580-8. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(07)80201-9

Namivandi-Zangeneh R, Sadrearhami Z, Dutta D, Willcox M, Wong EHH, Boyer C. Synergy between Synthetic Antimicrobial Polymer and Antibiotics: A Promising Platform To Combat Multidrug-Resistant Bacteria. ACS Infect Dis. 2019;5(8):1357-1365. doi:10.1021/acsinfecdis.9b00049

Neil A. Baker, Paul D. Eleazer, Robert E. Averbach, Samuel Seltzer. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. Journal of Endodontics, 1975,1, Issue 4, Pages 127-135, ISSN 0099-2399, https://doi.org/10.1016/S0099-2399(75)80097-5.

Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. nt Endod J 2011 Jul;44(7):583-609. PMID: 21366626. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011. 01872.x

Nguyen TLA, Bhattacharya D. Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. Molecules. 2022 Apr 12;27(8):2494. doi: 10.3390/molecules27082494. PMID: 35458691; PMCID: PMC9029217.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. 2003;52(1):1. doi:10.1093/jac/dkg301

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(1):38–41. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00749. x. PMID: 14718055.

Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against Enterococcus faecalis. General Dentistry. 2006 Sep-Oct;54(5):319-322. PMID: 17004565.

Ooi HY, Tee WY, Davamani F, Nagendrababu V. Comparing the antimicrobial efficacy of pediocin with chlorhexidine and calcium hydroxide as intracanal medicaments against persistent root canal infections. J Conserv Dent. 2019; 22:241–4. doi: 10.4103/JCD.JCD_521_18.

Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against Brucella melitensis. J Clin Microbiol. 2005;43(1):140-143. doi:10.1128/JCM.43.1.140-143.2005

Ørstavik D. Apical periodontitis: microbial infection and hostresponses. In: Ørstavik, D. (Ed.) Essential endodontology, 2ndedition. Oxford, UK: Wiley Blackwell. 2020. pp. 1–10

Osonga FJ.; Akgul A; Miller RM; Eshun GB; Yazgan I; Akgul A; Sadik OA. Antimicrobial Activity of a New Class of Phosphorylated and Modified Flavonoids. *ACS Omega.* 2019, *4*, 12865–12871

Osonga FJ; Onyango JO; Mwilu SK; Noah NM; Schulte J; An M; Sadik O. Synthesis and characterization of novel flavonoid derivatives via sequential phosphorylation of quercetin. Tetrahedron Lett. 2017, 58, 1474–1179. 10.1016/j.tetlet.2017.02.085.

Özçelik B, Orhan I, Toker G. Antiviral and Antimicrobial Assessment of Some Selected Flavonoids. Z. Für Nat. C. 2006; 61:632–638. doi: 10.1515/znc-2006-9-1003.

Özdemir O, Hazar E, Koçak S, Sağlam BC, Koçak MM. The frequency of sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment: An observational clinical study. Aust Dent J. 2022 doi: 10.1111/adj.12924. doi: 10.1111/adj.12924. Epub ahead of print. PMID: 35707880

Pagliari S, Forcella M, Lonati E, Sacco G, Romaniello F, Rovellini P, Fusi P, Palestini P, Campone L, Labra M, Bulbarelli A, Bruni I. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of Cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) Bark Extract after In Vitro Digestion Simulation. Foods. 2023 Jan 18;12(3):452. doi: 10.3390/foods12030452. PMID: 36765979; PMCID: PMC9914695.

Paiva YF, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM, Amadeu LTS, Santos FSD, Reis CGD, Carvalho AJBA, Lima MDS, Lima AGB, Gomes JP, Moura RL, Moura HV, Silva ETV. Physicochemical Aspects, Bioactive Compounds, Phenolic Profile and In Vitro Antioxidant Activity of Tropical Red Fruits and Their Blend. Molecules. 2023 Jun 20;28(12):4866. doi: 10.3390/molecules28124866. PMID: 37375421; PMCID: PMC10302636.

Park M, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10] -gingerol and [12] -gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. Phytother Res. 2008; 22:1446–1449. doi: 10.1002/ptr.2473.

Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppin-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. J Dent. 2009 Dec;37(12):903-8. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.004. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19665276.

Pinto KP, Barbosa AFA, Silva EJNL, Santos APP, Sassone LM. What Is the Microbial Profile in Persistent Endodontic Infections? A Scoping Review. J Endod. 2023 Jul;49(7):786-798.e7. doi: 10.1016/j.joen.2023.05.010. Epub 2023 May 19. PMID: 37211309.

Porras G, Chassagne F, Lyles JT, Marquez L., Dettweiler, M., Salam, A.M., Samarakoon, T., Shabih, S., Farrokhi, D.R., Quave, C.L., 2021. Ethnobotany and the role of plant natural products in antibiotic drug discovery. Chem. Rev. 121 (6), 3495–3560.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. Med Oral Patol Oral y Cir Bucal. 2019;24(3):e364–72. doi: 10.4317/medoral.22907. PMID: 31041915.

Prasad N, Dasson Bajaj P, Shenoy R, Dutta A, Thomas MS. Sodium Hypochlorite Concentration and Postendodontic Pain - Unveiling the Optimal Balance: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Endod. 2024 Sep;50(9):1233-1244. doi: 10.1016/j.joen.2024.06.005. Epub 2024 Jun 15. PMID: 38880472.

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of Psidium guajava on fish pathogens. Fitoterapia. 2007 Sep;78(6):434-6. doi: 10.1016/j.fitote.2007.03.015. Epub 2007 May 5. PMID: 17553634.

Razak FA, Othman RY, Rahim ZH. The effect of Piper betle and Psidium guajava extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. J Oral Sci. 2006 Jun;48(2):71-5. doi: 10.2334/josnusd.48.71. PMID: 16858135.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug;36(8):1277-88. Epub 2010 Jun 14. PMID: 20647081. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007.

Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal–treated teeth with apicalperiodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. Journal of Endodontics. 2009. 35, 493–502.

Ricucci D, Siqueira Junior JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug;36(8):1277-88. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as roots canal irrigants: a molecular microbiology study. J Endod. 2011 Feb;37(2):143-50. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.006. PMID: 21238793.

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;36(1):45–52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022

Rocha CT, de Lima PMN, Pereira TC, de Carvalho LS, Diamantino MGG, Abu Hasna A, da Rocha JC, de Oliveira LD, Carvalho CAT. Antibacterial and Antibiofilm Effect of *Lavandula dentata* L. Essential Oil as Endodontic Irrigant Against Standard and Clinical Strains of *Enterococcus* spp. *Applied Sciences*. 2025; 15(10):5534. https://doi.org/10.3390/app15105534

Rodrigues RC, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, et al. Influence of the apical preparation size and the irrigant type on bacterial reduction in root canal-treated teeth with apical periodontitis. J Endod. 2017 Jul;43(7):1058-63. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.02.004

Rollet C, Gal L, Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: A comparative study of adhesion and physiological characteristics in Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett. 2009; 290:135–142. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01415. x.

Rossi-Fedele G, Rödig T. Effectiveness of root canal irrigation and dressing for the treatment of apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Int Endod J. 2023 Oct;56 Suppl 3:422-435. doi: 10.1111/iej.13777. Epub 2022 May 31. PMID: 35579074.

Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. J Endod. 2020;46(8):1032-1041.e7. doi: 10.1016/j.joen.2020.05.002. PMID: 32413440.

Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, et al. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on Enterococcus faecalis: a systematic review and meta-analysis. J Appl Oral Sci 2014;22:356–65.

Saffari F, Sobhanipoor MH, Shahravan A, Ahmadrajabi R. Virulence genes, antibiotic resistance and capsule locus polymorphisms in Enterococcus faecalis isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Infect Chemother. 2018;50:340–5. doi: 10.3947/ic.2018.50.4.340.

Santos TdSA, Meccatti VM, Pereira TC, Marcucci MC, Hasna AA, Valera MC, de Oliveira LD, Carvalho CAT. Antibacterial Effect of Combinations of Salvia officinalis and Glycyrrhiza

glabra Hydroalcoholic Extracts Against Enterococcus spp. Coatings. 2023; 13(9):1579. https://doi.org/10.3390/coatings13091579

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin North Am. 1974 Apr;18(2):269-96. PMID: 4522570

Scotti R, Stringaro A, Nicolini L, Zanellato M, Boccia P, Maggi F, Gabbianelli R. Effects of Essential Oils from *Cymbopogon* spp. And *Cinnamomum verum* on Biofilm and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157:H7. Antibiotics (Basel). 2021 Jan 25;10(2):113. doi: 10.3390/antibiotics10020113. PMID: 33504089; PMCID: PMC7911385.

Selestino Neta MC, Vittorazzi C, Guimarães AC, Martins JD, Fronza M, Endringer DC, Scherer R. Effects of β-caryophyllene and Murraya paniculata essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. Pharm Biol. 2017 Dec;55(1):190-197. doi: 10.1080/13880209.2016.1254251. PMID: 27927082; PMCID: PMC6130565.

Sharma J, Jhamb S, Mehta M, Bhushan J, Bhardwaj SB, Kaur A. Characterization of *Enterococcus faecalis* associated with root canal failures: Virulence and resistance profile. J Conserv Dent Endod. 2025 Jul;28(7):602-606. doi: 10.4103/JCDE.JCDE_190_25. Epub 2025 Jul 2. PMID: 40746465; PMCID: PMC12310113

Sharma J, Panwar D, Bhushan J, Mehta M, Sidhu K, Jhamb S, et al. An in vitro evaluation of antibacterial effect of curcumin-loaded chitosan nanoparticle-coated gutta-percha against Staphylococcus aureus . J Conserv Dent Endod. 2023;26:560–3. doi: 10.4103/jcd.jcd_302_23.

Silva PV, Guedes DF, Nakadi FV, Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. Int Endod J. 2013 Apr;46(4):332-8. Epub 2012 Sep 13. PMID: 22970844. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02119. x.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Int Endod J. 2022 May;55 Suppl 3:512-530. doi: 10.1111/iej.13677. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34958494.

Siqueira JF Jr, Silva WO, Romeiro K, Gominho LF, Alves FRF, Rôças IN. Apical root canal microbiome associated with primary and posttreatment apical periodontitis: A systematic review. Int Endod J. 2024 Aug;57(8):1043-1058. doi: 10.1111/iej.14071. Epub 2024 Apr 18. PMID: 38634795.

Siqueira JF, Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod. 2008;34:1291–301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.

Siqueira Jr JF, Antunes HS, Pérez AR, Alves FR, Mdala I, Silva EJ, et al. The apical root canal system of teeth with pos-treatment apical periodontitis: correlating microbiologic, tomographic, and histopathologic findings. J Endod. 2020 Sep;46(9):1195-203. https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.05.020

Siqueira Jr JF, Rocas IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiolendod. 2009, Jan, 107, pp. 870-878. doi:10.1016/j.tripleo.2009.01.044

Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res*. 2018;32(suppl 1):e65. Published 2018 Oct 18. doi:10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0065

Sousa CM de M, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS da, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PB de M, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova; 2007; 30(2), 351–355. https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021

Souza WFC, de Lucena FA, de Castro RJS, de Oliveira CP, Quirino MR, Martins LP. Exploiting the chemical composition of essential oils from Psidium cattleianum and Psidium guajava and its antimicrobial and antioxidant properties. J Food Sci. 2021 Oct;86(10):4637-4649. doi: 10.1111/1750-3841.15889. Epub 2021 Sep 5. PMID: 34486118.

Strindberg, L. The Dependence of the Results of Pulp Therapy on Certain Factors—An Analytical Study Based on Radiographic and Clinical Follow-up Examination. Acta Odontologica Scandinavica. 1956, 14, 1-175.

Svensäter G e Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endodontic Topics, 2005, Apr 9, 27–36. https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00112.x

Taylor HD, Austin JH. THE SOLVENT ACTION OF ANTISEPTICS ON NECROTIC TISSUE. *The Journal of experimental medicine*. 1918; Jan; *27*(1), 155–164. https://doi.org/10.1084/jem.27.1.155

Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Int J Mol Sci. 2020 Nov 17;21(22):8671. PMID: 33212950; PMCID: PMC7698413. doi: 10.3390/ijms21228671

Tian C, Shao Y, Jin Z, Liang Y, Li C, Qu C, Sun S, Cui C, Liu M. The protective effect of rutin against lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice based on the pharmacokinetic and pharmacodynamic combination model. J Pharm Biomed Anal. 2022 Feb 5; 209:114480. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114480. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34839052.

Usjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. Microb Pathog. 2019; 131:186-196. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.015

Valera MC, Oliveira SA, Maekawa LE, Cardoso FG, Chung A, Silva SF, Carvalho CA. Action of Chlorhexidine, Zingiber officinale, and Calcium Hydroxide on Candida albicans, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, and Endotoxin in the Root Canals. The journal of contemporary dental practice, 2016, 17(2), 114–118. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1812

Vasudeva A, Sinha DJ, Tyagi SP, Singh NN, Garg P, Upadhyay D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against Enterococcus faecalis: An in-vitro study. Singapore Dent J. 2017 Dec; 38:39-44. doi: 10.1016/j.sdj.2017.06.001. PMID: 29229073.

Versiani MA, Martins J, Ordinola-Zapata R. Anatomical complexities affecting root canal preparation: a narrative review. Aust Dent J. 2023 Jun;68 Suppl 1:S5-S23. doi: 10.1111/adj.12992. Epub 2023 Nov 20. PMID: 37984802.

Vieira AR, Siqueira Junior JF, Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. J Endod. 2012 Feb;38(2):250-4. https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.10.019

Vivekananda Pai AR. Factors influencing the occurrence and progress of sodium hypochlorite accident: A narrative and update review. J Conserv Dent. 2023 Jan-Feb;26(1):3-11. doi: 10.4103/jcd.jcd_422_22. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36908722; PMCID: PMC10003279.

Wang Y, Fang L, Wang P, Qin L, Jia Y, Cai Y, Liu F, Zhou H, Wang S. Antibacterial Effects of Silica Nanoparticles Loading Nano-silver and Chlorhexidine in Root Canals Infected by Enterococcus faecalis. J Endod. 2025 Jan;51(1):54-63. doi: 10.1016/j.joen.2024.11.004. Epub 2024 Nov 14. PMID: 39547456.

Wang Y, Liu XJ, Chen JB, Cao JP, Li X, Sun CD. Citrus flavonoids and their antioxidant evaluation. Critical reviews in food science and nutrition; 2022; 62(14), 3833–3854. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870035

Weiner DK, Ernst E. Complementary and alternative approaches to the treatment of persistent musculoskeletal pain. Clin J Pain. 2004 Jul-Aug;20(4):244-55. PMID: 15218409. doi: 10.1097/00002508-200407000-00006.

WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.

Wijesinghe GK, de Oliveira TR, Maia FC, de Feiria SB, Barbosa JP, Joia F, Boni GC, Höfling JF. Efficacy of true cinnamon (Cinnamomum verum) leaf essential oil as a therapeutic alternative for Candida biofilm infections. Iran J Basic Med Sci. 2021 Jun;24(6):787-795. doi: 10.22038/ijbms.2021.53981.12138. PMID: 34630956; PMCID: PMC8487610.

Wijesinghe GK, Maia FC, de Oliveira TR, de Feiria SNB, Joia F, Barbosa JP, Boni GC, Sardi JCO, Rosalen PL, Höfling JF. Effect of Cinnamomum verum leaf essential oil on virulence factors of Candida species and determination of the in-vivo toxicity with Galleria mellonella model. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020 Sep 25;115:e200349. doi: 10.1590/0074-02760200349. PMID: 32997002; PMCID: PMC7523505.

Wiwattanarattanabut K; Choonharuangdej S; Srithavaj T. In vitro anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from culinary herbs. J. Clin. Diagn. Res. 2017, 11, DC30–DC35.

Xu H, Ye Z, Zhang A, Lin F, Fu J, Fok ASL. Effects of concentration of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant on the mechanical and structural properties of root dentine: A laboratory study. Int Endod J. 2022 Oct;55(10):1091-1102. doi: 10.1111/iej.13800. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35833329; PMCID: PMC9545283.

Yanakiev S. Effects of Cinnamon (Cinnamomum spp.) in Dentistry: A Review. Molecules. 2020 Sep 12;25(18):4184. doi: 10.3390/molecules25184184. PMID: 32932678; PMCID: PMC7571082.

Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. Int J Mol Sci. 2019 Jul 12;20(14):3423. PMID: 31336824; PMCID: PMC6679078. doi: 10.3390/ijms20143423.

Yunes RA, Filho VC, Ferreira J, Calixto JB. The use of Natural Products as Sources of New Analgesic Drugs. 2005. 191–212. doi:10.1016/S1572-5995(05)80033-X.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA e ANTIENDOTOXINA DOS EXTRATOS DE Myrciaria cauliflora, Cinnamomum verum E Psidium guajava COMO SOLUÇÕES IRRIGADORAS SOBRE BIOFILME MISTO MICROBIANO EM CANAIS RADICULARES [modelo ex vivo]

Pesquisador: Cláudio Antonio Talge Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 85994624.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.389.222

Apresentação do Projeto:

As doenças pulpares e periapicais são as doenças inflamatórias ou infecciosas orais mais prevalentes (Tiburcio-Machado et al., 2021) causadas por microrganismos que colonizam o sistema de canais radiculares (Kakehashi et al,1965; Möller et al., 1981; Ricucci & Siqueira, 2010; Sundqvist, 1976). São encontradas em grande maioria comunidades polimicrobianas, organizadas na forma de biofilme e aderidas às paredes do canal radicular. O objetivo do tratamento endodôntico é a redução da quantidade de microrganismos, de seus subprodutos e tecidos remanescentes no sistema de canais radiculares. Para isso, é necessário a realização de um preparo químico-mecânico eficaz, ativação da substância química auxiliar, utilização de medicação intracanal entre sessões e selamento apical e coronal adequado (Ercan et al., 2006; Barbosa-Ribeiro et al., 2021).A periodontite apical secundária ou persistente, é uma doença infecciosa que acomete os tecidos perirradiculares e na persistência de sinais e/ou sintomas clínicos e radiográficos em dentes com tratamento endodôntico prévios. (Siqueira Jr. et al, 2022). A microbiota de dentes com infecção

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - prédio anexo I Ramal 9028
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br

endodôntica nesses casos apresenta-se como infecções mistas, mas com uma microbiota menos diversa do que nas infecções primárias (Siqueira
et al., 2020; Murad et al., 2014; Sakamoto et al., 2008). Dentre os microrganismos estudados, Enterococcus faecalis é uma das espécies mais
prevalentes encontradas em casos de insucesso do tratamento endodôntico ou com periodontite apical pós-tratamento (Pinheiro et al., 2003;
Siqueira et al., 2004; Zhang et al., 2015; Alghamdi & Shakir, 2020). Isso se deve ao fato dessa espécie ter a capacidade de sobreviver a condições
adversas.Outras espécies bacterianas puderam ser isoladas em altas frequências nos casos de periodontite apical pós-tratamento. Barbosa-Ribeiro
et al. (2021) realizaram uma investigação microbiológica para verificar os microrganismos existentes na infecção endodôntica secundária. As
bactérias mais prevalentes encontradas foram E. faecalis, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia e Fusobacterium nucleatum. De acordo
com Zhang et al. (2015), os casos de periodontite periapical pós-tratamento, E. faecalis foi mais prevalente do que em casos de periodontite
periapical primária. (Gomes et al., 2008; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al., 2008; Rôças & Siqueira, 2012; Sakamoto et al., 2008; Siqueira & Rôças,
2004, 2005b; Sundqvist et al., 1998; Zandi et al., 2018).Para o desenvolvimento de novos antimicrobianos a OMS classifica a Pseudomonas
aeruginosas um patógeno prioritário (Mahavy et al., 2024; WHO 2017), devido a multirresistência a antibióticos (WHO 2017) e devido a sua
construção de biofilme protetor (Yin et al., 2019; Moradali et al., 2017) devido as diferentes formas de composição de biofilme, como quórum sensing
(Vandeputte et al., 2011), sistema regulatório de dois componentes GacS/GacA, o complexo cAMPVfr e a concentração do pool de c-di-GMP do
segundo mensageiro (Moradali et al., 2017). O uso de fitoterápico com ação antimicrobiana contra P. aeruginosas está sendo amplamente testado
(Dolatabadi et al., 2018).Para além do conhecimento das microbiotas presentes nas periodontites apicais, é necessário conhecer o potencial
inflamatório parar os tecidos periapicais (Gabrielli et al 2018). Bacterias Gram-negativas apresentam em sua membrana externa endotoxinas,
conhecidas como lipopolissacarídeos (LPS) que é liberado durante a multiplicação ou morte

celular ¿ responsável pela reabsorção óssea do
hospedeiro (Khoury et al., 2024; Machado et al., 2020). Bacterias Gram-positivas possuem o ácido lipoteicócio (LTA) ¿ oferecem adesão bacteriana
atuando na formação do biofilme bacteriano (Khoury et al., 2024; Gabrielli et al 2018).Perante a problemática da microbiota persistente nos canais
radiculares os materiais vegetais utilizados como fitoterápicos incluem diversos tipos de plantas, sendo medicamentos obtidos exclusivamente de
matérias-primas vegetais, com fins profiláticos, curativos ou para fins de diagnóstico. Essas substâncias apresentam diferentes mecanismos
biológicos como antibacterianos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antivirais, antiparasitários, antitumoral etc. (Parham et al., 2020; Saratale et al.,
2020). Muitos estudos provam que os fitoterápicos são uma fonte importante de moléculas as quais exibem atividade antimicrobiana e com o
potencial de eliminação de toxinas, sendo capazes de defender o hospedeiro contra patógenos (Simões et al., 2018; Warris et al., 2018; Najafloo et
al., 2020, Alexa et al.,2018, Al-Kalaldeh et al, 2010).Os estudos com extratos de plantas têm ganhado cada vez mais espaço e reconhecimento
devido a sua eficácia antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, baixa toxicidade e ausência de resistência microbiana (Farooqui et al., 2015; Acquaviva et al., 2019; de Lima et al., 2021; Agarwal et al., 2023; Khoury et al., 2024). Dentro desse
contexto, estudos recentes apoiam o uso de fitoterápicos como substâncias auxiliares durante o tratamento endodôntico. Em 2023, Agarwal et al.
avaliaram a eficácia antimicrobiana do extrato de folhas de eucalipto, quando utilizado como irrigante intrarradicular, contra patógenos endodônticos
persistentes como, E. faecalis. Makade et al. (2024) testaram alguns extratos contra patógenos endodônticos a fim de avaliar suas propriedades
antimicrobianas, podendo concluir que todos os extratos estudados apresentaram efeitos potenciais contra E. faecalis, F. nucleatum, Actinomyces,
Lactobacilli e S. aureus.Dentre muitos extratos relatados na literatura, a Cinnamomum verum, Myrciaria cauliflora e Psidium guajava são matériasprimas
vegetais com potenciais biológicos. Conhecida popularmente como canela, em 2023 o estudo de Mecatti et al. demonstrou importantes
propriedades antimicrobianas da C. verum contra patógenos multirresistentes, encontrando em

sua composição compostos fenólicos e flavonóides
sugerindo potencial efeito sinérgico em combinações antimicrobianas. O extrato hidroetanólico de jabuticaba (M. cauliflora) foi estudado por de
Oliveira et al. (2024) demonstrando propriedades antimicrobianas promissoras contra patógenos orais, além de compostos fitoquímicos em sua
composição que atuam como agentes antimicrobianos (Fidelis,et al., 2021), antifúngicos e antioxidantes, interceptando invasões microbianas, sendo
fortemente sugerido para investigações clínicas futuras.O gênero Psidium apresenta folhas simples e opostas originaria da America tropical e
subtropical, a espécie mais conhecida é Psidium guajava ou, goiabeira, produtora do fruto goiaba (Rattanachaikunsopon et al., 2010). Folhas de P.
guajava possui propriedades antimicrobianas contra Staphylococcus aureus, Escherichia coli e P. aeruginosa (Cheruiyot et al., 2009), propriedades
antiinflamatória e reduzem a capacidade de ligação hidrofóbica da superfície celular bacteriana (Razak et al. 2006).O desenvolvimento de novas
substâncias a partir de produtos naturais que possam sanar a resistência antimicrobiana torna-se fundamental. Portanto, esses materiais vegetais
são fortemente considerados e apresentam grande potencial para novas pesquisas na área de endodontia como soluções irrigadoras a fim de
auxiliar na descontaminação intrarradicular.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Os objetivos serão avaliar atividade antimicrobiana e anti-endotoxinas dos extratos fitoterápicos Jabuticaba, Canela e Goiabeira sobre cepas clínicas
de E. faecalis e P. aeruginosas, em culturas planctônicas, biofilmes e em modelos unirradiculares de dentina, determinando associações sinérgicas
dos extratos.

Objetivo Secundário:

Os objetivos específicos estudo serão: a. Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos fitoterápicos sobre cepas de E. faecalis e P. aeruginosas
determinando concentrações microbicidas e sinérgicas dos extratos pelo método de microdiluição checkerboard;b. Avaliar a ação antibiofilme
das associações sinérgicas dos extratos fitoterápicos sobre cepas de E. faecalis e P.

aeruginosas.c. Avaliar a ação antibiofilme e anti-endotoxinas
das associações sinérgicas dos extratos fitoterápicos sobre cepas de E. faecalis e P. aeruginosas, em modelo de biofilme por 20 minutos e 24
horas.d. Avaliar a ação antibiofilme e anti-endotoxina dos extratos fitoterápicos sobre cepas de E. faecalis e P. aeruginosas, em raíz unirradicular
por 20 minutos e 24 horas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Acerca das amostras que serão utilizados na pesquisa, as quais são provenientes do Biobanco do ICT Unesp São José dos Campos, estas correm
risco de, durante o desenvolvimento da pesquisa serem manipulados de forma incorreta, podendo haver trincas ou fraturas, o que poderá acarretar
na inviabilidade deste. Além disso, pode ocorrer perda da amostra. Devido ao tempo necessário para realização da pesquisa, o pesquisador pode
apresentar cansaço devido ao esforço repetitivo durante a execução desta.

Benefícios:

Com base nos resultados da pesquisa, será possível estabelecer o protocolo de irrigação ou medicação intracanal como forma de potencializar os
efeitos antimicrobianos além de ser mais eficaz para a prática clínica, comparando o desempenho de fitoterapicos com hipoclorito de sódio e soro.
Isso permitirá otimizar a desinfecção do sistema de canais radiculares e, consequentemente, melhorar o prognóstico dos tratamentos endodônticos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Com este estudo, espera-se determinar associações sinérgicas de extratos naturais que tragam benefícios terapêuticos no tratamento endodôntico,
incluindo ação antimicrobiana e anti-endotoxinas, contribuindo para os avanços científicos do uso de extratos de plantas na Odontologia, em
especial na Endodontia. Com os resultados que serão obtidos nesta fase do estudo, pretende-se desenvolver produtos para uso clínico, como
irrigantes e/ou medicações intracanais, os quais seguirão, posteriormente, para a fase pré-clínica do estudo. Com isso, pretende-se com esta
pesquisa contribuir de forma significativa para o embasamento científico do uso endodôntico

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP

destes fitoterápicos e suas associações sinérgicas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o Termo de Disponibilidade de Material Biológico, do Biobanco do ICT-CSJC-UNESP.

Recomendações:

Nd.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo nenhum impedimento ético, o protocolo poderá ter sua continuidade.

Considerações Finais a critério do CEP:

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPh-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site https://www.ict.unesp.br/ ¿ Sobre o ICT ¿ Comissões e Comitês - Comite de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2462130.pdf	28/01/2025 14:43:16		Aceito
Outros	termo_de_disponibilidade_29_29_assinado_assinado.pdf	28/01/2025 14:23:23	Cláudio Antonio Talge Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_final.pdf	05/12/2024 20:26:49	CAROLINE TREFIGLIO ROCHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Comitedeetica_correto.docx	04/12/2024 20:14:40	CAROLINE TREFIGLIO ROCHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_reformulado.pdf	24/11/2024 19:02:35	CAROLINE TREFIGLIO ROCHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - prédio anexo I Ramal 9028
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 15 de Fevereiro de 2025

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - prédio anexo I Ramal 9028
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br