



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

MARIANA GADELHO GIMENEZ DIAMANTINO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
SINÉRGICOS E ANTIBIOFILMES DOS EXTRATOS DE
Rosmarinus officinalis L. e *Plinia cauliflora* SOBRE
MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO
ENDODÔNTICA SECUNDÁRIA**

2024

MARIANA GADELHO GIMENEZ DIAMANTINO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SINÉRGICOS E
ANTIBIOFILMES DOS EXTRATOS DE *Rosmarinus officinalis* L. e *Plinia
cauliflora* SOBRE MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO
ENDODÔNTICA SECUNDÁRIA**

Dissertação 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 MESTRE, 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.

Orientador: Prof. Tit. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Lucas de Paula Ramos

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. 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).

Diamantino, Mariana Gadelho Gimenez

Caracterização fitoquímica, avaliação dos efeitos sinérgicos e antibiofilmes dos extratos de *Rosmarinus officinalis* L. e *Plinia cauliflora* sobre microrganismos envolvidos na infecção endodôntica secundária. / Mariana Gadelho Gimenez Diamantino. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientador: Lucas de Paula Ramos

1. Extratos vegetais. 2. Sinergismo farmacológico. 3. Endodontia. I. Carvalho, Cláudio Antonio Talge, orient. II. Ramos, Lucas de Paula, 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.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Ao explorar as propriedades desses extratos, este estudo tem o potencial de oferecer alternativas inovadoras para o tratamento de infecções endodônticas secundárias. Além de proporcionar tratamentos mais eficazes, essa abordagem pode desempenhar um papel na redução da resistência antibiótica, uma preocupação global crescente. 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. Em um contexto mais amplo, a possível aplicação desses extratos em outras áreas da saúde, além de sua integração em práticas clínicas e educacionais, destaca o impacto transdisciplinar desta pesquisa. Esse estudo pode inspirar novas abordagens terapêuticas naturais. Assim, o trabalho não apenas contribui para a evolução do tratamento de infecções endodônticas, mas também sinaliza uma trajetória potencial para a pesquisa de agentes antimicrobianos naturais em diversas aplicações.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

By exploring the properties of these extracts, this study has the potential to offer innovative alternatives for the treatment of secondary endodontic infections. In addition to providing more effective treatments, this approach may play a role in reducing antibiotic resistance, a growing global concern. The research also opens doors to a deeper understanding of synergistic interactions between natural compounds, stimulating interest in herbal medicine and highlighting the complexity and therapeutic potential of plant-derived substances. In a broader context, the possible application of these extracts in other areas of health, in addition to their integration into clinical and educational practices, highlights the transdisciplinary impact of this research. This study may inspire new natural therapeutic approaches. Thus, the work not only contributes to the evolution of the treatment of endodontic infections, but also signals a potential trajectory for research into natural antimicrobial agents in various applications.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera Garakis

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jonâtas Rafael de Oliveira

Universidade Anhembi Morumbi

Escola de Medicina

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 23 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que em Sua infinita bondade e misericórdia, sabendo dos sonhos e das agonias do meu coração, sempre colocou as pessoas certas em meu caminho para que eu chegasse hoje até aqui.

Toda Honra e Glória são dEle e para Ele!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, devo todo e qualquer agradecimento a **Deus** e à **Nossa Senhora Aparecida**, da qual sou muito devota desde pequena, por todas as providências, intercessões, bençãos, coragem e constante renovação da minha fé nos momentos de dificuldade! Por terem colocado o chão para que eu trilhasse o meu caminho e, dessa forma, encontrasse pessoas maravilhosas as quais dividi os meus dias e compartilhei da minha história.

Um agradecimento muito especial ao meu marido, **Pedro Diamantino**, que não consigo escrever sem me emocionar! Pedro é a minha fortaleza, refúgio e amizade para toda hora. A pessoa que encontro apoio incondicional e um porto-seguro no qual posso confiar em qualquer circunstância, sempre pronto para tudo. Obrigada por ter sido o meu alicerce por tantas vezes, por ter confiado em mim quando eu já não confiava mais e por ter aberto os meus olhos para o meu potencial por diversas vezes. Você é, sem dúvidas, o meu grande incentivador! Aproveitando, não posso deixar de agradecer a **Nina**, a cachorrinha mais companheira e alegre! Que por tantas vezes me fez companhia nas tardes de escrita e me chamava a atenção quando eu abusava de muitas horas em frente ao computador.

À minha mãe, **Márcia Gadelho**, por ser a minha base forte, por me encorajar para tudo durante toda a vida, por ter feito de tudo para que sempre pudesse dispor dos melhores estudos e melhores condições para que eu tivesse um bom futuro! Obrigada por ser a minha amiga e minha companheira para sempre! Eu te amo muito e prometo sempre honrar os esforços e renúncias que fez por mim.

Ao meu pai, **Rogério Gimenez**, por se fazer presente mesmo distante fisicamente. Obrigada por todo apoio, dedicação, suporte e amor por toda a vida!

Aos meus sogros, **Wagner e Carla**, por me acolherem como uma verdadeira filha, sempre fazendo muito por mim! Realmente fui muito abençoada em ter encontrado pessoas como vocês. Obrigada por todo o apoio, presteza e doação. À minha cunhada, **Ana Luísa**, por ser uma amiga-irmã, pelas suas palavras de incentivo, apoio e momentos descontraídos. Obrigada por estar sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida! Amo vocês!

Ao meu querido orientador, **Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, minha eterna gratidão pela oportunidade, pela sua dedicação, presteza, paciência e amizade durante esses anos. Obrigada por lidar com a pós-graduação de forma leve, nos dando prazer em trabalhar e amar percorrer o caminho! O senhor é um exemplo não só de profissional, mas de pessoa. Sempre tratando seus orientados com muito respeito e cordialidade.

À minha eterna orientadora, **Profa. Luciane Dias de Oliveira**, por ser uma verdadeira inspiração profissional e pessoal. Por ter me incentivado a seguir o caminho da pós-graduação, por sempre estar a postos para toda e qualquer ajuda, por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento da minha pesquisa. Obrigada pela sua energia revigorante, pelo seu alto-astral e sua dedicação em sempre nos ajudar.

À **banca examinadora**, por ter aceitado prontamente o meu convite. **Profa. Márcia Carneiro Valera** pela boa convivência, respeito e cortesia desde a época da graduação. A senhora foi minha professora de laboratório de endodontia e dividir o momento da minha defesa de mestrado é uma alegria e satisfação imensas! Obrigada pelos inúmeros ensinamentos. **Prof Jonatas Rafael de Oliveira** que ainda não o conheço pessoalmente, mas tenho excelentes referências quanto ao profissionalismo, competência e bom caráter. Com certeza você será uma pessoa que agregará muito a este momento!

À toda minha família (**Gadelho-Gimenez-Diamantino**), avós, tios, primos, cada um do seu jeitinho, pelo incentivo, união, por se fazerem presentes em minha vida mesmo que alguns estejam longe fisicamente e por aplaudirem as minhas conquistas e vitórias.

À **Raquel Teles e Lara Carvalho**, sem vocês nada seria possível! Assumiram a minha pesquisa como se fosse delas, ajudando em cada etapa, ensinando, auxiliando. Literalmente pegando na minha mão por diversas vezes. Meninas, vocês são muito especiais! O meu total reconhecimento e agradecimento a vocês. Obrigada pela convivência prazerosa e feliz!

Aos meus **amigos da pós-graduação** (Carolzinha, Felipe, Thais, Aline, Camila, Bia, Mari, Gu e Carol Gagliardi) pela convivência agradável e momentos descontraídos. Obrigada por tornarem a jornada mais leve e alegre com a presença de vocês!

Aos **professores de endodontia**, Profa. Márcia, Profa. Ana Paula, Profa. Rayana e Prof. Amjad pela convivência agradável, por toda ajuda e ensinamentos transmitidos.

À **banca de EGQ**, Profa. Vanessa e Prof. Amjad por terem contribuído tanto com o meu trabalho, enriquecendo e trazendo melhoras significativas.

À **Profa. Cristina Marcucci** por todo suporte, disponibilidade e ensinamentos. Mesmo muito distante fisicamente, sempre está pronta para nos ajudar com muita alegria e bom-humor.

Aos **funcionários, servidores e técnicos** por se esforçarem por um ambiente agradável, acolhedor e profissional no interior da faculdade e no bom funcionamento das clínicas. Agradeço especialmente à **Evelyn e a Josi** pelo convívio divertido, leve e por todo auxílio nas clínicas.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

" Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.".

Odes de Ricardo Reis. Fernando Pessoa.

RESUMO

Diamantino MGG. Caracterização fitoquímica, avaliação dos efeitos sinérgicos e antibiofilmes dos extratos de *Rosmarinus officinalis* L. e *Plinia cauliflora* sobre microrganismos envolvidos na infecção endodôntica secundária. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

Com o aumento de microrganismos resistentes nos canais radiculares, os estudos de extratos de plantas com ação antibacteriana têm aumentado visando terapias alternativas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos sinérgicos sobre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* e a ação antibiofilme dos extratos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Plinia cauliflora* (jabuticaba). Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) por microdiluição em caldo e Índice de Concentração Inibitória Fracionada e Índice de Concentração Microbicida Fracionada por microdiluição *checkerboard*. Posteriormente, a ação da concentração efetiva dos extratos foi avaliada sobre biofilmes formados em poços de placa de microtitulação. Os biofilmes foram expostos a dois diferentes períodos de tratamento com os extratos, por 5 min e 24 h, sendo n=10 para cada grupo experimental. Como controles foram utilizados solução salina 0,9% (C+) e hipoclorito de sódio 2,5% (C-), totalizando 5 grupos para cada microrganismo e cada tempo experimental. Em seguida, os biofilmes foram submetidos ao teste de MTT. Foram realizadas análises da atividade citotóxica dos extratos sobre as linhagens de queratinócitos humanos (HaCat) pelo teste de MTT. A análise estatística foi feita aplicando método ANOVA e teste de Dunn (significância de 5%). Ambos os extratos demonstraram fitocompostos fenólicos e flavonóides e possuem ação antioxidante. Os extratos apresentam ação antimicrobiana para as cepas estudadas e quando foram associados, apresentaram concentrações aditivas para cepa de *E. faecalis*. Em relação a propriedade antibiofilme, o extrato de alecrim apresentou boa redução da viabilidade microbiana de *E. faecalis*, com redução de 52% para o tempo de 5 min e de 40% para 24 h. Para as cepas de microrganismos anaeróbios, para a cepa de *F. nucleatum*, o extrato de jabuticaba reduziu em até 73% o biofilme. Para a cepa de *P. gingivalis* houve redução de até 41% para o extrato de jabuticaba e de até 57% para o extrato de alecrim. Quanto a citotoxicidade em HaCat, demonstrou que após tratamento com diferentes concentrações dos extratos, ambos apresentaram citotoxicidade estatisticamente semelhante ao hipoclorito de sódio 2,5%. Diante disso, pode-se concluir que ambos os extratos apresentam ação antioxidante e antimicrobiana em culturas planctônicas, exceto o extrato de jabuticaba para *C. albicans*. Quanto a associação dos extratos, não houve ação sinérgica, mas obteve-se resultado aditivo para cepa clínica de *E. faecalis* 2. A ação antibiofilme foi efetiva para as cepas de *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. A citotoxicidade dos extratos apresentou semelhança estatística com o hipoclorito de sódio 2,5% para ambos.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Sinergismo farmacológico. Endodontia.

ABSTRACT

Diamantino MGG. *Phytochemical characterization, evaluation of the synergistic and antibiofilm effects of Rosmarinus officinalis L. and Plinia cauliflora extracts on microorganisms involved in secondary endodontic infection. [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.*

With the increase in resistant microorganisms in root canals, studies of plant extracts with antibacterial action have increased aiming at alternative therapies. The objective of this study was to evaluate the synergistic effects on *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* and the antibiofilm action of hydroethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Plinia cauliflora* (jabuticaba). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicide Concentration (MCC) were determined by broth microdilution and the Fractional Inhibitory Concentration Index and Fractional Microbicide Concentration Index by checkerboard microdilution. Subsequently, the effect of the effective concentration of the extracts was evaluated on biofilms formed in microtiter plate wells. The biofilms were exposed to two different periods of treatment with the extracts, for 5 min and 24 h, with n=10 for each experimental group. As controls, 0.9% saline solution (C+) and 2.5% sodium hypochlorite (C-) were used, totaling 5 groups for each microorganism and each experimental time. Then, the biofilms were subjected to the MTT test. Analysis of the cytotoxic activity of the extracts on human keratinocyte lines (HaCat) was carried out using the MTT test. Statistical analysis was performed using the ANOVA method and Dunn's test (5% significance level). The results that both extracts demonstrated phenolic and flavonoid phytochemicals and have antioxidant action. The extracts have antimicrobial action for the strains studied and when they were combined, they presented additive concentrations only for the *E. faecalis* strain. Regarding the antibiofilm property, the rosemary extract showed a good reduction in the microbial viability of *E. faecalis*, with a reduction of 52% for 5 min and 40% for 24 h. For strains of anaerobic microorganisms, in contact with the *F. nucleatum* strain, the jabuticaba extract reduced biofilm by up to 73%. For the *P. gingivalis* strain, there was a reduction of up to 41% for the jabuticaba extract and up to 57% for the rosemary extract. As for cytotoxicity in HaCat, it was demonstrated that after treatment with different concentrations of extracts, both showed cytotoxicity statistically similar to 2.5% sodium hypochlorite. Given this, it can be concluded that both extracts have antioxidant and antimicrobial action in planktonic cultures, except the jabuticaba extract for *C. albicans*. Regarding the association of extracts, there was no synergistic action, but an additive result was obtained for the clinical strain of *E. faecalis* 2. The antibiofilm action was effective for the strains of *E. faecalis*, *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. The cytotoxicity of the extracts showed statistical similarity with 2.5% sodium hypochlorite for both.

Keywords: Plant Extracts. Drug Synergism. Endodontics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Infecção endodôntica secundária.....	16
2.1.1 Uso de terapias integrativas e complementares na Odontologia	18
3 PROPOSIÇÃO	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Preparação dos extratos.....	23
4.1.1 Cálculo de teor de sólidos solúveis dos extratos.....	24
4.1.2 Avaliação da composição fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) dos extratos.....	25
4.1.3 Avaliação da atividade supressora (atividade antioxidante) de radicais livres dos extratos.....	26
4.1.4 Determinação de flavonóides totais nas amostras dos extratos	27
4.1.5 Determinação de fenóis totais nas amostras dos extratos	27
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em culturas planctônicas.....	28
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos isolados.....	29
4.2.2 Ensaio de microdiluição <i>checkerboard</i> das associações dos extratos	30
4.2.3 Atividade sobre biofilmes formados.....	31
4.3 Análise da citotoxicidade dos extratos	32
4.3.1 Teste colorimétrico de MTT	33
4.4 Análise estatística	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Cálculo de teor de sólidos solúveis dos extratos.....	35
5.2 Avaliação da composição fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) dos extratos.....	35

5.3 Avaliação da atividade supressora (atividade antioxidante) de radicais livres dos extratos	37
5.4 Determinação de flavonóides totais nas amostras dos extratos	37
5.5 Determinação de fenóis totais nas amostras dos extratos	38
5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em culturas planctônicas.....	39
5.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos isolados.....	39
5.7 Ensaio de microdiluição checkerboard das associações dos extratos	40
5.7.1 Sobre <i>Enterococcus</i>	40
5.7.2 Sobre <i>Candida albicans</i>	41
5.7.3 Sobre cepas de microrganismos anaeróbios	41
5.8 Atividade sobre biofilmes formados.....	41
5.9 Análise da citotoxicidade dos extratos	45
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos que colonizam o sistema de canais radiculares e os seus subprodutos são os causadores de doenças pulpares e periapicais (Kakehashi et al, 1965). Portanto, a finalidade da terapia endodôntica é a limpeza dos canais radiculares, seus subprodutos e os tecidos remanescentes contaminados (Ercan et al, 2006; Barbosa-Ribeiro et al, 2021).

Na literatura, a taxa de sucesso da terapia endodôntica varia de 70 a 95% (Weigner et al, 1998), no entanto, existem casos de insucesso onde a redução da infecção, que é a principal causa, é insuficiente para restabelecer ou manter a saúde dos tecidos perirradiculares (Siqueira et al, 2008). Portanto, quando os microrganismos resistem aos procedimentos de limpeza e desinfecção dos canais radiculares e recolonizam os tecidos periapicais, pode acarretar uma infecção persistente onde podemos denominá-la de “periodontite apical secundária ou persistente” (Dioguardi et al., 2023).

A microbiota de dentes com infecção endodôntica secundária ou persistente é diferente das infecções primárias, apresentando-se como uma comunidade polimicrobiana com microrganismos gram-positivos e gram-negativos, bacilos e cocos, anaeróbios facultativos e estritos (Machado et al., 2020). Sabe-se que a presença de espécies gram-positivas e gram-negativas dentro dos mesmos canais radiculares tem efeitos potenciais na doença endodôntica (Gabrielli et al, 2022). Além disso, a presença de fungos são mais frequentes nas infecções persistentes (Siqueira et al, 2004).

Andrade et al. (2011) analisaram a predominância de *Enterococcus* spp. Em canais radiculares com necrose pulpar e encontram 94% de infecções com *E. faecalis* e 3% com *E. faecium*. Embora o número de casos de *E. faecium* tenha sido pequeno, existem estudos que demonstram números maiores nas infecções endodônticas (Ferreira et al., 2015; Murad et al., 2014). Barbosa-Ribeiro et al. (2021) verificaram os microrganismos existentes na infecção endodôntica secundária. As bactérias mais prevalentes encontradas neste estudo foram *E. faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*. Sendo *E. faecalis* e *P. gingivalis* as bactérias frequentemente cultivadas em todas as etapas do retratamento, o que mostra grande

resistência desses microrganismos às etapas do tratamento endodôntico. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Pourhajibagher et al, em 2017, cepas de *Candida albicans* também foram isoladas em casos de infecções endodônticas persistentes. Em estudos utilizando técnicas moleculares, a prevalência de *C. albicans* em casos de retratamento foi de 16% (Alberti et al., 2021), sendo esse fungo associado como um fator causal ao fracasso do tratamento endodôntico (Nouroloyouni et al., 2023).

Para eliminar microrganismos e tecidos contaminados, além do preparo biomecânico dos canais radiculares é de suma importância a utilização de substâncias químicas auxiliares para o sucesso do tratamento endodôntico. O hipoclorito de sódio é considerado o padrão-ouro devido suas capacidades antibacterianas e de dissolução tecidual, sendo o irrigante mais utilizado na endodontia (Haapasalo et al., 2014). Estudos *in vitro* concluíram que a estrutura dos biofilmes microbianos poderia afetar sua suscetibilidade ao hipoclorito de sódio (Cai et al., 2023).

Perante o desafio de driblar a infecção endodôntica e a resistência microbiana, a fitoterapia é uma área que vem se expandindo e o estudo dos extratos de plantas medicinais é uma alternativa na busca de substâncias microbicidas. Com o aumento expressivo de microrganismos resistentes, os estudos de extratos de plantas com ação antibacteriana têm aumentado visando novas formulações (Rajasekharan et al., 2017; Gupta et al., 2017).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos utilizando exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico em benefício do usuário (Portaria 06/95 ANVISA). No Brasil e no mundo, os extratos de plantas são utilizados pela população de maneira empírica, baseados em relatos isolados, ou pela cultura popular no tratamento de suas enfermidades (Farooqui et al., 2015; Rajasekharan et al., 2017).

A utilização das combinações de fitoterápicos que tem formulação holística quando separados, em determinadas proporções, formam um único composto apresentando efeitos farmacológicos de forma sinérgica (Li et al., 2017) potencializando a ação de interação com proteínas e contra microrganismos. Dentre a grande gama de possibilidades no ramo dos fitoterápicos, o extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e de jabuticaba (*Plinia cauliflora*) merecem destaque por mostrarem relatos quanto ao seu emprego biológico, o que nos sugere um favorável desempenho frente a microrganismos envolvidos na infecção endodôntica

secundária/persistente.

O alecrim é referido pela sua capacidade antimicrobiana e antioxidante, mas é tipicamente utilizada como aromatizante e conservante alimentício (Borges et al., 2019; de Oliveira et al., 2019). Moore et al. (2016) em estudo *in vitro* e *in vivo*, demonstraram atividade antitumoral devido ao efeito de apoptose e da diminuição da sobrevivência celular com extrato de alecrim e extrato de poli-fenóis. Em 2018, Hickl et al. concluíram que plantas mediterrâneas incluindo folhas de alecrim, apresentam efeito significativo antimicrobiano contra *Streptococcus mutans*. Na revisão sistemática realizada por Neves et al. (2018) concluíram que o alecrim pode ser utilizado na área da saúde por suas propriedades farmacológicas e novas formulações devem ser estudadas. De Oliveira et al. (2019) verificaram que o extrato da planta tem ação antibiofilme, uma vez que apresentou redução das taxas de biofilme monomicrobianos de *E. faecalis*, *S. mutans*, *C. albicans*. Em biofilmes polimicrobianos, também apresentou redução do biofilme de *C. albicans*, podendo ser eficiente na prevenção da aderência de biofilmes na superfície de dentes, aparelho ortodônticos, mucosa oral e próteses.

A *Plinia cauliflora*, conhecida popularmente como jabuticabeira, é uma árvore frutífera presente em grande parte do Brasil. A casca do fruto é adstringente, eficaz contra constipações e irritações cutâneas. Na medicina popular, tem indicações como antiasmático, para inflamações intestinais e hemoptises (Mohanty et al., 2009). Fidelis et al. (2020) demonstraram que o extrato da semente de jabuticaba possui propriedades antioxidantes, exerceu efeitos citotóxicos contra células cancerígenas, apresentou efeitos antimicrobianos em microrganismos gram-positivos e gram-negativos, demonstrou efeitos anti-hemolíticos, inibiu as atividades da α -amilase, α -glicosidade e da enzima conversora de angiotensina. Suas propriedades antimicrobianas também foram relatadas por Hacke et al. (2016). Dessa forma, a possibilidade de aplicação do extrato de jabuticaba demonstra alto valor agregado.

Perante a problemática da microbiota persistente nos canais radiculares, pelo conhecimento das potenciais propriedades biológicas e fitoterapêuticas dos extratos citados e dos efeitos sinérgicos que potencializam os efeitos antimicrobianos, pode-se aplicar como parte de formulações alternativas, driblando as limitações para combater e prevenir doenças bucais relacionadas a infecções endodônticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção endodôntica secundária

Em 2020, Barbosa-Ribeiro et al., com o objetivo de investigar a microbiota em dentes com infecção endodôntica secundária em diferentes fases do retratamento endodôntico, contou com vinte dentes unirradiculares obturados e com periodontite apical. As amostras foram coletadas com pontas de papel absorvente estéreis antes do preparo químico-mecânico, após o preparo químico-mecânico e após 30 dias de medicação com hidróxido de cálcio. As bactérias que puderam ser cultivadas foram avaliadas pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias e o DNA dos microrganismos foram extraídos e avaliados pelo método PCR. Os autores puderam observar que foram detectadas bactérias cultiváveis em todas as amostras iniciais. O preparo químico-mecânico reduziu as bactérias em 99,4% e a medicação intracanal, após 30 dias, reduziu as bactérias em 99,5%. Os microrganismos mais encontrados foram: *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Para *E. faecalis* e *P. gingivalis*, houve baixa redução após o preparo e *F. nucleatum* teve seu DNA significativamente reduzido. A medicação intracanal não favoreceu a redução microbiana. Dessa forma, os autores puderam concluir que *E. faecalis* e *P. gingivalis* foram frequentemente encontrados em todas as etapas do retratamento e são microrganismos resistentes aos procedimentos endodônticos.

Gomes et al., em 2021, elucidaram a presença de periodontite apical no canal radicular em dentes com infecção secundária, incluindo a composição da microbiota, os níveis de endotoxinas e ácido lipoproteico e as implicações clínicas desses fatores. Para tanto, os autores selecionaram 50 pacientes que precisavam de retratamento endodôntico e apresentavam evidência radiográfica de periodontite apical. Para a identificação dos microrganismos, foi utilizada a técnica de cultura e testes bioquímicos. O teste Nested-PCR foi utilizado para identificar 17 espécies bacterianas. O teste lisado de amebócitos de *Limulus* e ensaios de imunoabsorção enzimática foram utilizados para quantificação de lipopolissacarídeos (LPS) e LTAs, respectivamente. *E. faecalis* e *Gemella morbillorum* foram as espécies mais

identificadas pelos testes bioquímicos, enquanto as análises moleculares mostraram elevada frequência de *P. gingivalis*, *E. faecalis* e *F. nucleatum*. LPS e LTA foram encontrados em todas as amostras, sendo que os níveis de LTA apresentaram correlações às características clínicas. Dessa forma, os autores puderam concluir que a microbiota de infecções secundárias apresenta grande variedade de espécies e foram encontradas correlações entre microrganismos específicos e sinais clínicos.

Zhang et al., em 2021, caracterizaram a comunidade microbiana presente no biofilme extrarradicular e nas lesões perirradiculares que estavam associadas à periodontite apical persistente. Para isso, dezoito pacientes que apresentavam lesões apicais persistentes foram selecionados e agendada a cirurgia endodôntica. No trans-operatório, foram coletadas amostras extrarradiculares e das lesões apicais. Dez amostras foram selecionadas aleatoriamente para clonagem e sequenciamento de 16S rRNA ribossômico. Ao todo, setenta e três filotipos pertencentes a seis filos diferentes foram identificados. Predominantemente *Mogibacterium timidum*, *Streptococcus intermedius* e *E. faecalis* nos biofilmes extrarradicular e das lesões apicais. No biofilme extrarradicular, foram encontradas com maior frequência *Propionibacterium propionicus*, *Abiotrophia adiacens*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Campylobacter gracilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Enquanto *Parvimonas micra* e *Atopobium rimae* foram mais abundantes nas lesões periapicais. Desse modo, os autores puderam concluir que o perfil microbiano dos biofilmes extrarradiculares difere das lesões periapicais e vários gêneros e espécies foram significativamente associados à formação de biofilmes extrarradiculares.

Godoi Jr et al., em 2023, tiveram o objetivo de traçar o perfil microbiológico de canais radiculares que foram indicados para retratamento endodôntico em decorrência a infecções endodônticas secundárias ou por motivos protéticos. Amostras foram coletadas de trinta dentes, onde 15 dentes foram indicados para retratamento por presença de periodontite apical crônica (grupo 1) e 15 dentes foram indicados por motivos protéticos, sem sinais clínicos e radiográficos de reinfecção endodôntica (grupo 2). As amostras foram coletadas em três momentos: Antes do preparo químico-mecânico (S1), depois do preparo químico mecânico (S2), e após 30 dias de medicação intracanal com hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% (S3). Foi realizado o teste Nested-PCR para detecção das espécies bacterianas. Para verificar a eficácia de cada etapa do retratamento endodôntico, foi realizada o método de

contagem de unidades formadoras de colônias. As espécies frequentemente encontradas no grupo S1 foi: *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Parvimonas micra*. Nas coletas iniciais, a carga microbiana do grupo com presença de periodontite crônica foi maior do que a do grupo com indicação protética. Com isso, os autores puderam concluir que a comunidade bacteriana presente nos canais radiculares indicados para retratamento é mista e heterogênea, mas que as indicações diferem quanto ao número e carga microbiana.

2.1.1 Uso de terapias integrativas e complementares na Odontologia

Abullais Saquib et al., em 2021, analisaram os efeitos sinérgicos de extratos de ervas com antibióticos sobre bactérias envolvidas na periodontite. Com o objetivo de estudar o efeito antimicrobiano, os autores avaliaram os efeitos sinérgicos dos extratos vegetais etanólicos de *Punica granatum* (pericarpo), *Commiphora molmol*, *Azadirachta indica* (casca) em combinação com amoxicilina, metronidazol, tetraciclina e azitromicina em bactérias periodontopáticas: *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *A. actinomycetemcomitans*. Dessa forma, as cepas bacterianas foram isoladas de pacientes com periodontite e cultivadas em condições favoráveis. Para definir a resistência microbiana aos antibióticos e aos extratos, foi utilizado o método de difusão em disco, medindo os halos das zonas de inibição. As concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas foram avaliadas contra cada bactéria em questão. Os efeitos sinérgicos das combinações dos extratos vegetais com os antibióticos foram testados contra cada microrganismo mediando o diâmetro da zona de inibição. Como resultados, os autores puderam analisar que todos os extratos estudados exibiram efeitos inibitórios na proliferação e no crescimento bacteriano. O efeito antibacteriano máximo foi exibido pelo extrato de *C. molmol* sobre *P. gingivalis*, mas nenhum efeito antibacteriano foi mostrado pelo extrato de *P. granatum* em *T. forsythia*. O melhor efeito sinérgico foi apresentado na combinação do extrato vegetal de *P. granatum* com amoxicilina contra *A. actinomycetemcomitans*. Portanto, os autores puderam concluir que as combinações de extratos vegetais e os antibióticos estudados apresentam efeitos sinérgicos sobre a atividade antibacteriana

contra todas os microrganismos envolvidos na periodontite que foram testados neste estudo.

Patil et al., em 2022 analisaram, em um estudo *in vitro*, a eficácia antimicrobiana do extrato de um cogumelo cuja espécie não foi identificada, *Aloe vera* e *Curcuma longa* em comparação ao efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio atuando como medicação intracanal contra *E. faecalis*. Para tanto, os autores utilizaram 120 dentes humanos extraídos, pré-molares permanentes, estes foram descoronados e seus canais radiculares receberam preparo químico-mecânico. Após todos os dentes passarem pelo processo de esterilização, foram introduzidos inóculos de *E. faecalis* e devidamente incubados para crescimento bacteriano. Foram utilizados cinco grupos, com n=24 e o efeito antibacteriano das diferentes medicações intracanaís foram analisadas em três períodos diferentes: 1, 7 e 14 dias completos. Dessa forma, registrando ao final de cada período a porcentagem de redução na contagem das colônias. Em síntese, os autores puderam concluir que a *Curcuma longa* apresentou redução percentual aumentada quando comparada aos demais extratos vegetais estudados e sua ação antibacteriana também foi superior ao hidróxido de cálcio.

Ainda avaliando os efeitos de diferentes medicações intracanaís contra *E. faecalis*, Thienngern et al., em 2022, testaram em um modelo de infecção *in vitro*, o efeito da pasta de quitosana como medicação intracanal contra biofilmes de *E. faecalis* e *C. albicans* comparando com os efeitos antimicrobianos da medicação com hidróxido de cálcio. Para tal análise, os autores dispuseram de trinta e seis raízes de dentes pré-molares e incisivos superiores humanos extraídos que foram preparadas e receberam o inóculo de *E. faecalis* durante 14 dias, enquanto trinta e duas raízes foram infectadas com *C. albicans* por 48 horas, para a formação de biofilme. As amostras de raízes foram divididas em seis grupos, onde o primeiro grupo foi o controle negativo (sem medicação), o segundo grupo recebeu Polietilenoglicol 20%, o terceiro grupo recebeu Propilenoglicol 20%, o quarto grupo recebeu hidróxido de cálcio, o quinto grupo recebeu Quitosana + Polietilenoglicol e o sexto e último grupo recebeu Quitosana + Propilenoglicol. Após 7 dias com as respectivas medicações em contato com os inóculos microbianos, a dentina da superfície intracanal foi coletada com o auxílio de uma lima Protaper e, em seguida, ressuspensa, diluída em série e semeada em ágar BHI para *E. faecalis* e ágar Sabouraud para *C. albicans* para que

as colônias pudessem ser contabilizadas. Dessa forma, o efeito antimicrobiano pôde ser determinado como porcentagem formadora de colônias (UFCs) restantes em comparação ao controle negativo. Desse modo, os autores puderam concluir que a pasta de quitosana apresentou melhor eficácia na redução de biofilme viável de *E. faecalis* quando comparada a medicação intracanal de hidróxido de cálcio, após o período de 7 dias. Em relação as colônias de *C. albicans*, não foi significamente diferente ao hidróxido de cálcio.

Em 2023, Meccatti et al., analisaram a ação antifúngica de extratos vegetais glicólicos de *Rosa centifolia* L., *Curcuma longa* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Punica granatum* L. espécies do gênero *Candida* em culturas planctônicas e biofilmes. Todos os extratos passaram por análise em cromatografia líquida de alta eficiência para caracterização fitoquímica, dessa forma, quantificando e qualificando os principais compostos presentes em cada extrato. As concentrações para a atividade antibiofilme de cada extrato foi determinada a partir das concentrações mínimas inibitórias e concentrações fungicidas mínimas e, após os tratamentos serem aplicados em biofilmes contra *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, foram avaliados pelo ensaio MTT. Como resultados, após os autores analisarem os extratos sinergicamente, os extratos tiveram ação antifúngica e antibiofilme, sendo que a combinação dos extratos vegetais glicólicos de *R. centifolia* L. e os extratos glicólicos de *C. longa* foram eficazes contra biofilmes de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, em diferentes períodos. A combinação dos extratos glicólicos de *R. officinalis* L. e *P. granatum* L. foi eficaz contra biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei* após 30 min, e contra *C. tropicalis* após 24 h, com todas as combinações apresentando uma redução média de 50% nos biofilmes estudados.

Em 2023, Farooq et al., tiveram o objetivo de avaliar o extrato de *Sapindus mukorossi* em comparação ao o EDTA 17% na remoção de esfregaço das porções coronal, média e apical de dentes unirradiculares. Para isso, noventa dentes humanos unirradiculares superiores e inferiores foram selecionados, divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais e um grupo controle. Onde: Grupo 1 recebeu o extrato etanólico de *Sapindus mukorossi*; Grupo 2 recebeu EDTA 17%; e o Grupo 3 água destilada como controle. Todos os dentes foram preparados com lima K por meio da técnica *step-back* e irrigados com hipoclorito de sódio a 5,25%. Após irrigação, os dentes foram seccionados e divididos longitudinalmente em duas metades e

observados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) para análise da quantidade de esfregaço ainda presente, utilizando o sistema de pontuação de três pontos. Como resultados, os autores puderam analisar que a camada de esfregaço foi completamente removida no terço coronal de 27 dos 30 dentes do primeiro grupo. Para os terços médio e apical do grupo 1, 24 e 19 dentes apresentaram remoção completa. No grupo 2, observou-se que havia 24, 21 e 3 dentes nos três terços com a camada de esfregaço completamente ausente. Portanto, os autores puderam concluir que o extrato vegetal etanólico de *Sapindus mukorossi* apresentou maior eficácia na remoção da camada de esfregaço dos canais radiculares estudados quando comparados aos grupos que receberam EDTA 17%.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos de *R. officinalis* L. (alecrim) e *P. cauliflora* (jabuticaba) sobre patógenos relacionados à infecção endodôntica secundária.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) Preparar os extratos hidroetanólicos de *R. officinalis* L. (alecrim) e *P. cauliflora* (jabuticaba);
- b) Analisar a atividade antioxidante dos extratos;
- c) Identificar os principais constituintes fitoquímicos presentes;
- d) Avaliar a atividade antimicrobiana planctônica e atividade antibiofilme dos extratos de *R. officinalis* (alecrim) e *P. cauliflora* (jabuticaba) isolados e em associações sobre *E. faecalis*, *E. faecium*, bactérias anaeróbias *F. nucleatum* e *P. gingivalis* e *C. albicans*;
- e) Analisar a citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos em queratinócitos humanos (HaCat).

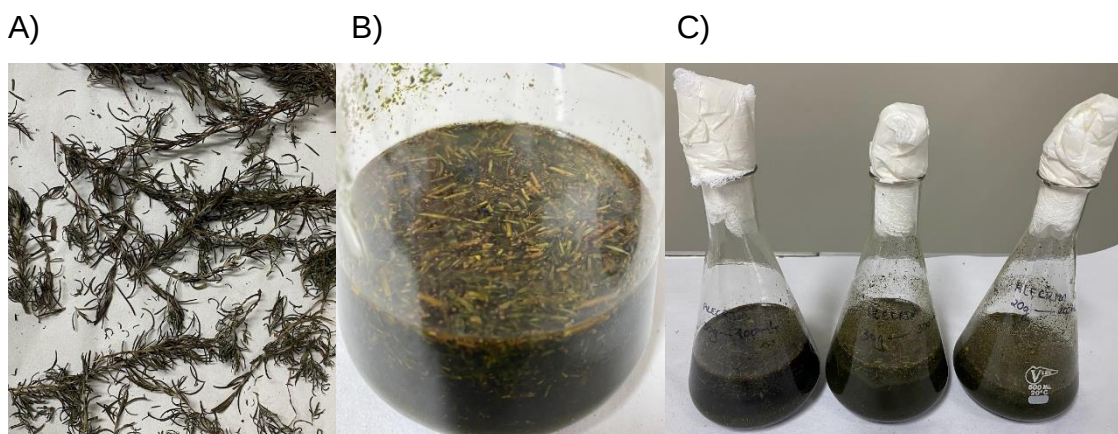
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação dos extratos

Os extratos de *R. officinalis* L. (alecrim) e *P. cauliflora* (jabuticaba) foram produzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Ciência e Tecnologia – Unesp.

Para a obtenção dos extratos hidroetanólicos de alecrim (EHA) e jabuticaba (EHJ), 30 g de folhas de alecrim e 30 g de casca de jabuticaba foram adicionadas em 150 mL de água ultrapura obtida em sistema Milli-Q® (EtOH:H₂O/50:50) e 150 mL de álcool etílico absoluto (álcool etílico 99,5% - Merk Darmstadt, Alemanha), com tempo de extração de 24 h. Por fim, os extratos foram filtrados em duas etapas: filtração para remoção dos resíduos sólidos (filtro de papel) e filtração para esterilização dos extratos (filtro de membrana 0,22 µm) e ambos estocados em tubos estéreis sob refrigeração. As Figuras 1 e 2 ilustram os procedimentos executados.

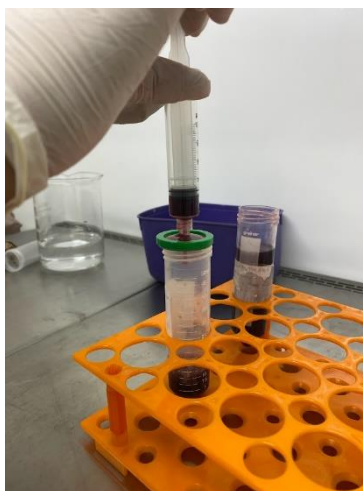
Figura 1 - Etapas da extração



Legenda: Preparo da matéria-prima para posterior extração (A); Produto vegetal disperso no veículo para produção do extrato (B e C).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 2 - Filtração em filtro de membrana do extrato vegetal para esterilização.



Legenda: Filtração para esterilização do extrato utilizando filtro de membrana 0,22 µm.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Cálculo de teor de sólidos solúveis dos extratos

Para os extratos preparados conforme o item anterior, foi determinado o teor de sólidos solúveis (TSS) para utilização no procedimento de atividade antioxidante. Esse teor foi obtido segundo o procedimento a seguir. Foram pesados béqueres de 25 mL e anotado os respectivos pesos. Em seguida, foram pipetados 5 mL dos extratos hidroetanólicos de alecrim e jabuticaba em cada um dos béqueres e levados à estufa (Fanem LTDA, São Paulo-SP, Brasil) a 60°C até a evaporação. Os béqueres foram retirados da estufa e resfriados em dessecador, como mostra a Figura 3.

Figura 3 - Resíduo seco dos extratos vegetais

A)



B)



Legenda: Béqueres contendo o resíduo seco dos extratos vegetais de jabuticaba (A) e alecrim (B) após terem sido retirados da estufa de secagem para posterior pesagem em balança de precisão.

Fonte: Elaborado pela autora.

Posteriormente, foram pesados e repetidas a operação até peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata. A quantidade de TSS dos extratos foi calculada conforme a equação a seguir:

$$\% \text{ m/V} = \frac{(m-b) \cdot 100}{V_o}$$

Onde: **% m/V** é o teor de sólidos solúveis; **(m-b)** é a massa do béquer com o extrato (m) - a massa do béquer sem o extrato (b); **V_o** é o volume de extrato utilizado para análise de sólidos solúveis.

4.1.2 Avaliação da composição fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) dos extratos

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi utilizada para caracterizar o perfil do conteúdo de marcadores nos extratos. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com um detector de fotodiodos (HPLC-DAD) e um injetor automático modelo D-7000 Merck-Hitachi (Darmstadt, Hesse, Alemanha). As condições cromatográficas foram, fase móvel: solução de ácido águafórmico (PA, Merck) diluída na proporção de 95: 5 (solvente A) e metanol grau cromatográfico-Merck (Darmstadt, Hesse, Alemanha, solvente B). O fluxo foi de 1

mL/min e um gradiente linear começando com 0% de B, finalizando com 70% de B, num tempo de corrida de 50 minutos. Os comprimentos de onda de detecção utilizados foram 280 e 340 nm. Os extratos foram formulados e analisados em parceria e sob a supervisão da profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

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

Este método tem por base a redução do radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em solução de álcool etílico absoluto, o qual apresenta o máximo de absorção na faixa de 515-528 nm. Ao fixar um hidrogênio, abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorbância, o que permite calcular após estabelecimento do equilíbrio da reação, quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH, (CE_{50} que é a concentração do extrato capaz de eliminar 50% dos radicais livres) (Veiga et al., 2017; Bueno et al., 2022). Para isso, os extratos foram diluídos a 1% V/V posteriormente, foi preparada uma diluição a 0,01% V/V. Em 11 tubos de ensaio, numerando-os de 0 até 10, foram adicionados (1000, 960, 920, 880, 840, 800, 760, 720, 680, 640, 600) μ L de álcool respectivamente em cada tubo de ensaio. Em seguida, sobre o álcool foram acrescentados 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400 μ L de extrato a 0,01%. O tubo no 0, foi o controle (100% de DPPH sem os extratos). Nele foram adicionados 1000 μ L de DPPH. Após 60 segundos, o DPPH foi adicionado aos demais tubos a cada 1 min. Com isso, a leitura no espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) foi realizada após 30 min da adição do DPPH no tubo 0. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de púrpura a amarelo pálido (Alves et al., 2010). Diante disso, a leitura foi realizada utilizando o comprimento de onda de 517 nm. Após a realização da cinética de descoloração, foi construído um gráfico do percentual de DPPH restante calculada por planilha de cálculo, versus a concentração do extrato (μ g/mL) e calculada a CE_{50} (concentração que elimina 50% dos radicais livres), através do método dos mínimos

quadrados.

4.1.4 Determinação de flavonóides totais nas amostras dos extratos

Para a determinação do teor de flavonóides totais dos extratos, foi preparada uma solução estoque (cuja concentração de TSS foi determinada previamente como descrito no item anterior) de 100 μL em um balão volumétrico de 10 mL onde acrescentou-se metanol até completar o menisco. A partir deste ponto, o procedimento foi realizado em triplicata. Foi retirada uma alíquota de 200 μL desta solução transferida para um balão de 10 mL, já com aproximadamente 5 mL de metanol. Em seguida, foram adicionados 200 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3) e o volume foi completado com metanol até próximo de 10 mL. A solução foi agitada e colocada em banho-maria por 30 min a 20°C. Após este tempo, acertou-se o menisco e a leitura de absorbância foi realizada em 425 nm utilizando um espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Após, a concentração de flavonóides totais expressos em quercetina foi calculada utilizando a equação da reta da curva-padrão.

4.1.5 Determinação de fenóis totais nas amostras dos extratos

A determinação do teor de fenóis totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (Dinâmica LTDA, Indaiatuba-SP, Brasil). Esta técnica emprega este reagente que complexa com um fenol, dando uma reação colorida, que pode ser medida pelo valor da absorbância a 760 nm (Marcucci et al., 2021).

Foi transferido 1 mL do extrato para um balão volumétrico de 100 mL, dissolvido em um pouco de etanol e o seu volume foi completado com água destilada lentamente e sob agitação (solução estoque) (10 mg/mL). A partir deste momento, o procedimento foi realizado em triplicata. Uma alíquota de 200 μL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL (1:50) contendo aproximadamente 5 mL de água destilada e 800 μL do reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado. A solução foi agitada

por 5 segundos e no intervalo de 1 a 8 min acrescentou-se 1,2 mL da solução de tampão carbonato-tartarato de sódio a 20%. O volume foi completado com água até próximo ao menisco e a solução foi mantida em um banho-maria a 20°C. Decorrido o tempo de 2 h, o menisco foi acertado até o volume final à temperatura ambiente, agitando-se por 5 segundos, e realizada a leitura em 760 nm, em espectrofotômetro. A concentração de fenóis totais expressos em ácido gálico, foi calculada utilizando-se a equação da reta da curva padrão.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em culturas planctônicas

A atividade antimicrobiana dos extratos isolados e das suas associações foram avaliadas sobre os microrganismos citados na Tabela 1. Essas cepas foram obtidas no banco de cepas do laboratório de Microbiologia e Imunologia de Instituto de Ciência e Tecnologia - São José dos Campos (ICT-Unesp), as quais já estão previamente cadastradas no SisGen.

Tabela 1 - Cepas utilizadas neste estudo.

<i>Enterococcus</i>	<i>Candida albicans</i>	Bactérias anaeróbias
<i>E. faecium</i> ATCC	<i>C.albicans</i> ATCC	<i>P. gingivalis</i>
<i>E. faecalis</i> ATCC	<i>C.albicans</i> 14	<i>F. nucleatum</i>
<i>E. faecalis</i> 4.2	<i>C.albicans</i> 60	-
<i>E. faecalis</i> 4	<i>C.albicans</i> 70	-
<i>E. faecalis</i> 2	-	-

Fonte: Elaborado pela autora

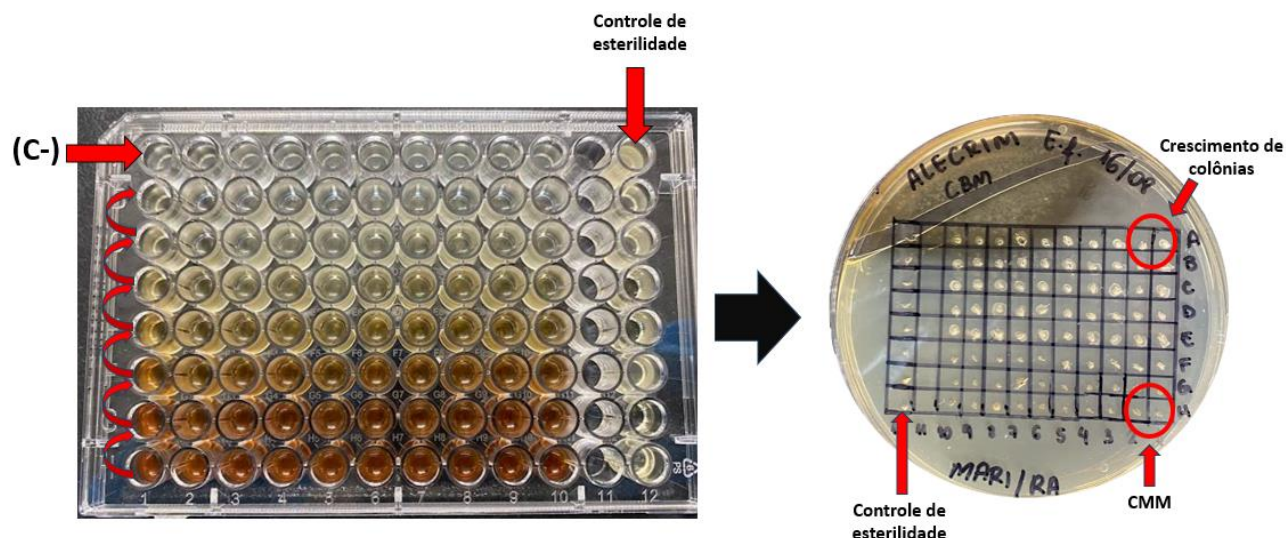
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos isolados

Para *E. faecalis*, *E. faecium* e *C. albicans* também foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme descrito no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), norma M7-A6, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos isolados para cada cepa. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (Kasvi, Curitiba - PR, Brasil), onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura, caldo Muller Hinton (HiMedia®, Mumbai, Índia) e 100 µL de cada extrato no primeiro poço da microplaca, de onde partiram 10 diluições seriadas. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana preparadas em solução fisiológica estéril, padronizada em espectrofotômetro em 10^6 UFC/mL, com os respectivos comprimentos de onda para cada microrganismo, foram adicionadas em todos os poços.

As placas foram incubadas por 24 h e foi verificada a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano, determinando a CIM no último poço da microplaca que não apresentar turvação. Em seguida, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e plaqueado em ágar para os respectivos microrganismos e, para cada extrato, a CMM foi determinada em placas sem crescimento de colônias. Este teste foi realizado em duplicata.

Para *F. nucleatum* e *P. gingivalis* a CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo conforme descrito no documento M11-A7 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os microrganismos foram cultivados em caldo Brucella (Acumedia, Michigan, USA) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril (Newprov, Pinhais - PR, Brasil), 1% de hemina (Sigma-Aldrich Co, Alemanha) e 1% de menadiona (Sigma-Aldrich) a 37°C por 48 h em câmara de anaerobiose (Whitley DG250 Workstation, Reino Unido). A Figura 4 ilustra a montagem das placas de microtitulação e a determinação da CIM e CMM dos extratos isolados.

Figura 4: Determinação da CIM e CMM dos extratos vegetais



Legenda: Ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM dos extratos hidroetanólicos de alecrim e jabuticaba para posterior determinação da Concentração Microbica Mínima (CMM) em ágar.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Ensaio de microdiluição *checkerboard* das associações dos extratos

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 (*E. faecalis*, *E. faecium* e *C. albicans*) e o caldo *Brucella* enriquecido com hemina e menadiona (*F. nucleatum* e *P. gingivalis*).

Para as combinações duplas dos extratos foram utilizados como referência os valores de CIM previamente obtidos. Para tanto, 50 μ L de cada diluição do primeiro extrato foram adicionadas no eixo x (horizontal) da microplaca, enquanto 50 μ L das diluições do segundo extrato foram adicionadas no eixo y (vertical) da microplaca de forma que foram associadas diferentes concentrações de ambos os extratos (Usjak et al., 2019; Fratini et al., 2017). Em seguida, foi adicionado o inóculo microbiano, padronizado em 10^6 UFC/mL, totalizando o volume de 200 μ L em cada poço, exceto no controle negativo que recebeu o caldo Mueller Hinton.

Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos, foi adotado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que classifica as combinações em sinérgicas, aditivas, indiferente e antagônicas. Foi feito o cálculo de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) em que a ICIF de cada extrato é igual a relação entre o seu valor de CIM na combinação com a sua CIM quando isolado (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh et al., 2019; Orhan et al., 2005).

Uma combinação é considerada sinérgica quando a ICIF $\leq 0,5$, aditiva quando a ICIF é $>0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando a ICIF >1 e ≤ 4 e antagonista quando a ICIF $>4,0$. A mesma fórmula foi utilizada para calcular o índice de concentração bactericida fracionária (ICBF), usando valores CBM em vez de CIM (Odds, 2003). Para isso, uma alíquota (10 μ L) foi semeada em ágar para os respectivos microrganismos. 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 *checkerboard*, as associações que apresentaram resultados sinérgicos ou aditivos foram utilizadas nos próximos testes.

4.2.3 Atividade sobre biofilmes formados

Para os biofilmes de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* foi utilizado caldo Brucella enriquecido com hemina e menadiona formado por 7 dias em câmara de anaerobiose com substituição deste meio a cada 48 h de cultivo. Para *E. faecalis*, *E. faecium* e *C. albicans* foi utilizado caldo BHI, onde as placas foram incubadas por 48 h a 37°C para a maturação dos biofilmes, sendo o meio de cultura substituído após 24 h.

Os biofilmes foram colocados em contato com cada extrato isolado ou com cada associação sinérgica ou aditiva dos extratos, separadamente, por dois períodos de tempo: 5 min e 24 h. Como controle utilizou-se a solução de hipoclorito de sódio 2,5%.

Para análise da atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de MTT, foram adicionados 200 μ L da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-a-yl) (2,5Diphenyltetrazolium - Bromide) e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h a

37°C. Após, a solução foi retirada e adicionados 200 µL de dimetilsufóxido (DMSO), seguido de incubação a 37°C por 10 min e agitação em shaker por mais 10 min. Após, as densidades ópticas foram lidas em leitora de microplaca em 570 nm e convertidas em percentual de atividade metabólica dos microrganismos por fórmula: % atividade metabólica = (do grupo tratado x 100) / média do grupo controle)

Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando n=12 para cada cepa microbiana, tempo de exposição e tratamento.

4.3 Análise da citotoxicidade dos extratos

Foram realizadas análises da atividade citotóxica dos extratos sobre queratinócitos humanos (HaCat). As células foram provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM - RJ). Foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia - Cotia, Brasil), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa a temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e 5% de CO₂. Durante o processo de expansão celular, o meio de cultivo foi substituído a cada 48 h e a partir dos momentos em que foi observado o estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as mesmas foram repassadas para frascos de cultivo maiores ou utilizadas para testes.

Para desagregação celular, a camada de células foi removida do assoalho do frasco de cultura com Tripsina com Edta 0,25% (Gibco, Grand Island, Nova York). As células suspendidas foram transferidas para um tubo de centrifugação (Sarstedt; Numbrecht, Alemanha) e submetidas a centrifugação por 5 min a 3000 rpm, promovendo assim a remoção do meio de cultivo consumido, seguido pela substituição por meio de cultivo fresco.

Para a contagem celular, alíquotas de 10 e 50 µL da suspensão de células foram misturadas a 90 e 50 µL, respectivamente, ao corante azul de trypan, obtendo as diluições 1/2 e 1/10. Em seguida, as diluições foram transferidas para a câmara de

Neubauer, onde foi realizada a contagem de células viáveis. Após a contagem dos 4 quadrantes laterais da câmara, foi realizada uma média dos resultados obtidos, sendo a média multiplicada pelo valor da diluição empregada na contagem, assim, foi obtido o valor de células/mL de solução utilizando o valor de correção do volume da câmara.

4.3.1 Teste colorimétrico de MTT

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi realizada por meio do teste colorimétrico de MTT, avaliando a atividade enzimática celular. Para tanto, as culturas de queratinócitos humanos (HaCat), foram transferidas para microplacas de 96 poços (TPP) na concentração de 2×10^4 células viáveis e cultivadas em 200 μ L de meio DMEM + 10% SFB. Após, as placas serem incubadas (37°C com 5% de CO₂) por 24 h para a aderência celular. Passado o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram expostas aos tratamentos que variaram a concentração conforme o tempo de aplicação. Para o período de 5 min de contato com os tratamentos, as células receberam a aplicação de meio DMEM + 10% SFB como controle negativo e hipoclorito de sódio 2,5% como controle positivo. Os tratamentos aplicados por 24 h contaram com a aplicação dos extratos nas concentrações testadas na CMM, como controle negativo foi utilizado meio de cultivo DMEM + 10% SFB e como controle positivo foi aplicado a solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Oliveira et al., 2013 e 2014). A Figura 5 ilustra a montagem das placas de microtitulação.

Figura 5: Placa de 96 poços contendo diferentes concentrações dos extratos vegetais diluídos em meio DMEM



Fonte: Elaborado pela autora

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Dunn ($p \leq 0,05$), utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Cálculo de teor de sólidos solúveis dos extratos

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 jabuticaba é de 22,22 mg/mL e o TSS do extrato hidroetanólico de alecrim é de 9,48 mg/mL, descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Teor de sólidos solúveis dos extratos.

Extrato/parte da planta	Solvente de extração	TSS (mg/mL)	DP
Casca (jabuticaba)	EtOH:H ₂ O (50:50)	22,22	0,0544
Folhas (alecrim)	EtOH:H ₂ O (50:50)	9,48	0,4977

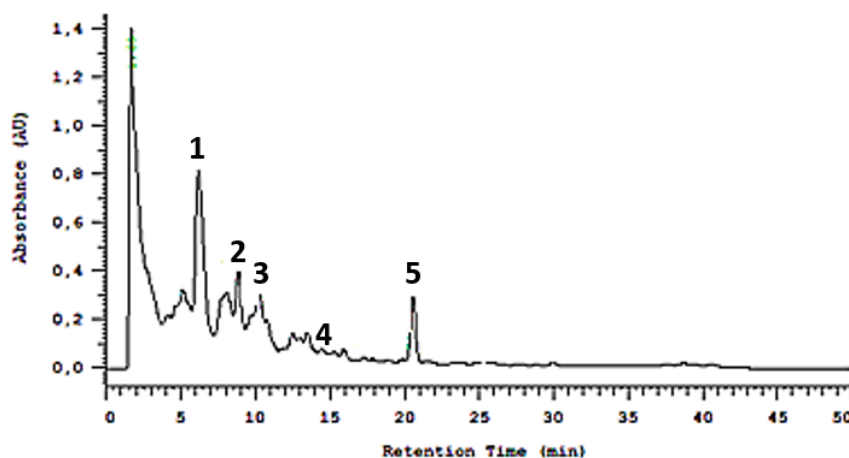
Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto; H₂O - água destilada; TSS - Teor de sólidos solúveis; DP - desvio padrão de três determinações.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Avaliação da composição fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) dos extratos

A análise cromatográfica por HPLC, no extrato hidroetanólico de alecrim, apresentou picos dos compostos de: ácido cafeoilquínico com tempo de retenção (TR) de 6 min, um galotanino com TR de 11 min, ácido clorogênico com TR de 10 min, ácido p-cumárico com TR de 15 min e uma quinona com TR de 20 min, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6: Cromatograma em HPLC do extrato de alecrim.

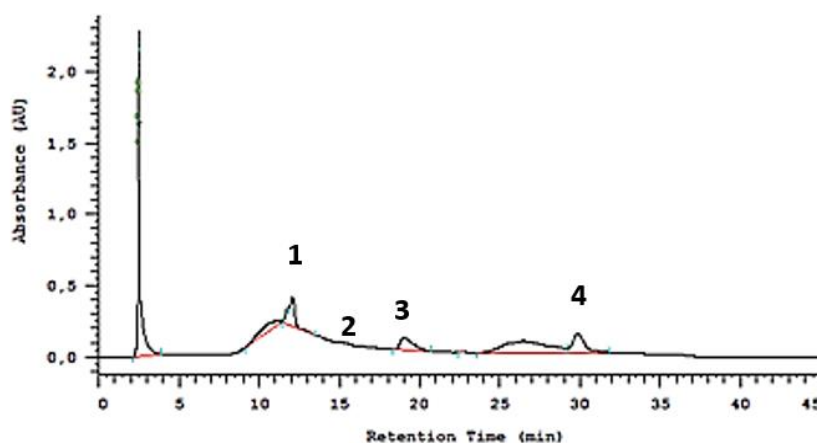


Legenda: Cromatograma em HPLC do extrato de alecrim. Os números representam os picos dos compostos: 1- ácido cafeoilquínico, 2- um galotanino, 3- ácido clorogênico, 4- ácido p-cumárico e 5- uma quinona.

Fonte: Elaborado pela autora.

No extrato hidroetanólico de jabuticaba, apresentou picos dos compostos: ácido gálico com TR de 12 min, ácido p-cumárico com TR de 16 min, derivado do ácido cinâmico com TR de 19 min e ácido elágico com TR de 30 min, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7: Cromatograma em HPLC do extrato de jabuticaba.



Legenda: Cromatograma em HPLC do extrato de jabuticaba. Os números representam os picos dos compostos: 1- ácido gálico, 2- ácido p-cumárico, 3- derivado do ácido cinâmico, 4- ácido elágico.

Fonte: Elaborado pela autora.

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

A concentração que elimina 50% dos radicais livres (CE_{50}) foi de 0,159 mg/mL e 0,059 mg/mL para os extratos de jabuticaba e alecrim, respectivamente. A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de jabuticaba e de alecrim estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da atividade antioxidante dos extratos.

Extrato	Tipo de extração	CE_{50} (mg/mL)
Jabuticaba	EtOH:H ₂ O (50:50)	0,159 ± 45,79
Alecrim	EtOH:H ₂ O (50:50)	0,059 ± 8,35

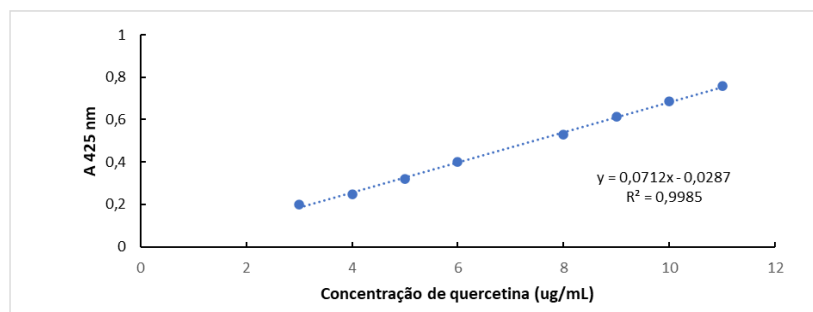
Legenda: EtOH:H₂O – hidroetanólico; CE_{50} - concentração que elimina 50% dos radicais livres.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Determinação de flavonóides totais nas amostras dos extratos

A curva-padrão construída com base em diferentes concentrações de quercetina está demonstrada na Figura 8.

Figura 8 - Curva-padrão expressa em quercetina



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da curva-padrão de quercetina, a quantidade de flavonóides totais dos extratos de jabuticaba e alecrim foi analisada. Para o extrato hidroetanólico de jabuticaba, a concentração de flavonóides foi de 0 mg/mL e para o extrato hidroetanólico de alecrim obteve-se o valor total de 0,158 mg/mL. Os valores estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Teor de flavonóides totais dos extratos.

Extrato/parte da planta	Solvente de extração	FLV (mg/mL)	DP
Jabuticaba (casca)	EtOH:H ₂ O (50:50)	0	0,055
Alecrim (folhas)	EtOH:H ₂ O (50:50)	0,158	10,163

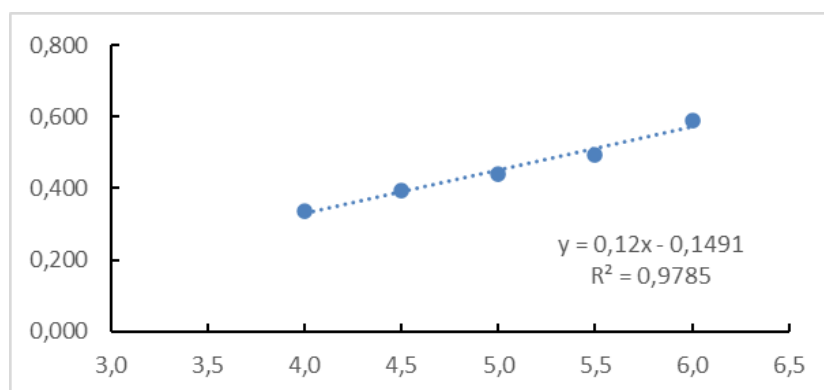
Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto; H₂O – água destilada; FLV – flavonoides totais; DP - desvio padrão de três determinações.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Determinação de fenóis totais nas amostras dos extratos

A curva-padrão construída com base no ácido gálico está demonstrada na Figura 9.

Figura 9 - Curva-padrão do ácido gálico.



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da curva-padrão do ácido gálico, os extratos de jabuticaba e alecrim foram analisados e apresentam o teor de fenóis totais de 0,729 mg/mL e 0,754 mg/mL,

respectivamente, como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Teor de fenóis dos extratos.

Extrato/parte da planta	Solvente de extração	Fenóis (mg/mL)	DP
Jabuticaba (casca)	EtOH:H ₂ O	0,729	7,139
Alecrim (folhas)	EtOH:H ₂ O	0,754	0,043

Legenda: EtOH - álcool etílico; H₂O - água destilada; DP - desvio padrão de três determinações.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em culturas planctônicas

5.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos isolados

No teste de microdiluição em caldo, não foi possível realizar a leitura visual para determinação da CIM dos extratos hidroetanólicos de jabuticaba e alecrim, uma vez que estes possuem coloração intensa e, muitas vezes, notava-se sedimentos no fundo dos poços da placa, próprio dos extratos vegetais.

O extrato hidroetanólico de alecrim para cepas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* apresentou CMM variando de 0,1 a 2 mg/mL, descritos individualmente na Tabela 6 para cada cepa estudada.

O extrato hidroetanólico de jabuticaba, para todas as cepas de *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* apresentou CMM entre 5 e 2,5 mg/mL. No entanto, o extrato vegetal de jabuticaba não promoveu ação microbicida para *E. faecium* e para nenhuma cepa de *C. albicans* utilizada neste estudo. Os resultados estão descritos individualmente na Tabela 6.

Tabela 6: CMM (mg/mL) do extrato hidroetanólico de alecrim e jabuticaba para cepas ATCC e clínicas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Cepas	CMM do extrato de	CMM do extrato de
	alecrim	jabuticaba
<i>C. albicans</i> 14	0,1 mg/mL	Sem inibição
<i>C. albicans</i> 60	2 mg/mL	Sem inibição
<i>C. albicans</i> 70	2 mg/mL	Sem inibição
<i>C. albicans</i> ATCC	1 mg/mL	Sem inibição
<i>E. faecium</i> ATCC	2 mg/mL	Sem inibição
<i>E. faecalis</i> 4.2	1 mg/mL	5 mg/mL
<i>E. faecalis</i> 2	1 mg/mL	5 mg/mL
<i>E. faecalis</i> 4	0,5 mg/mL	5 mg/mL
<i>E. faecalis</i> ATCC	0,5 mg/mL	5 mg/mL
<i>F. nucleatum</i>	0,1 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>P. gingivalis</i>	1 mg/mL	2,5 mg/mL

Legenda: CMM – Concentração Microbicida Mínima.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.7 Ensaio de microdiluição checkerboard das associações dos extratos

5.7.1 Sobre *Enterococcus*

Segundo o cálculo de ICBF, a cepa *E. faecalis* 2 apresentou um resultado aditivo com valor de ICBF $\leq 0,50$, descrito na Tabela 7. Para a cepa de *E. faecium* estudada, a associação dos extratos de jabuticaba e alecrim não promoveu efeitos sinérgicos ou aditivos.

Tabela 7: Associação dos extratos para *E. faecalis*.

Cepa E.f	CMM EHJ (mg/mL)	CMM EHA (mg/mL)	CMM comb. EHJ (mg/mL)	CMM comb. EHA (mg/mL)	ICBF	Redução CMM EHJ	Redução CMM EHA	Efeito
2	0,5	0,1	2,5	0,03	0,53	2x	33x	ADITIVO

Legenda: Ef – *E. faecalis*; EHJ- Extrato hidroetanólico de jabuticaba; EHA – Extrato hidroetanólico de alecrim; CMM – Concentração Microbicida Mínima; Comb. – combinação; ICBF: índice de concentração bactericida fracionada. Os valores estão expressos em mg/mL.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.7.2 Sobre *Candida albicans*

As associações dos extratos vegetais de jabuticaba e alecrim não promoveram efeitos sinérgicos ou aditivos para nenhuma cepa de *C. albicans*, segundo o cálculo de ICBF.

5.7.3 Sobre cepas de microrganismos anaeróbios

De acordo com o cálculo de ICBF, as associações do EHA e o EHJ não apresentaram efeitos sinérgicos ou aditivos para as cepas de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* analisadas neste estudo.

5.8 Atividade sobre biofilmes formados

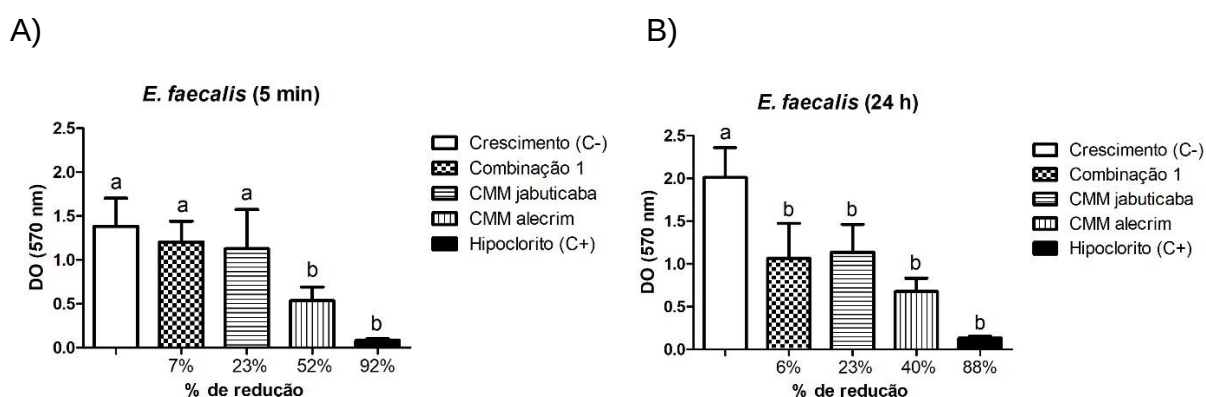
Com base nos resultados obtidos nos efeitos das associações dos extratos vegetais, os extratos que obtiveram ICBF sinérgica ou aditiva foram testados para atividade antibiofilme, juntamente com as concentrações isoladas contra os microrganismos estudados, para os tempos de 5 min e 24 h.

Para a cepa de *E. faecalis* 2, após o período de tratamento de 5 min com os extratos de jabuticaba, alecrim e a combinação aditiva descrita no item anterior (item 5.7.1), houve redução estatisticamente significativa de viabilidade do biofilme em 52%

($p \leq 0,05$) com o tratamento feito pelo extrato de alecrim isolado com concentração de 1 mg/mL, como demonstrado na Figura 10A.

Após o tempo de tratamento com os extratos vegetais isolados e a combinação aditiva no período de 24 h, todos os tratamentos aplicados no biofilme apresentaram redução estatisticamente significativa, sendo de 6% ($p \leq 0,05$) de redução da viabilidade do biofilme com tratamento feito pela associação aditiva, ou seja, com concentração de 2,5 mg/mL de extrato de jabuticaba e de 0,03 mg/mL de extrato de alecrim associados. Para o tratamento com extrato isolado de jabuticaba, houve redução de 23% ($p \leq 0,05$) do biofilme formado utilizando uma concentração de extrato de 5 mg/mL. No tratamento feito com o extrato isolado de alecrim, houve redução estatisticamente significativa de 40% ($p \leq 0,05$) de redução da viabilidade do biofilme utilizando a concentração de 1 mg/mL de extrato (Figura 10B).

Figura 10 – Tratamentos de biofilmes formados de *E. faecalis* 2.



Legenda: DO – Densidade óptica; CMM - Concentração Mínima Microbicida; As letras “a” e “b” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Dunn.

Fonte: Elaborado pela autora.

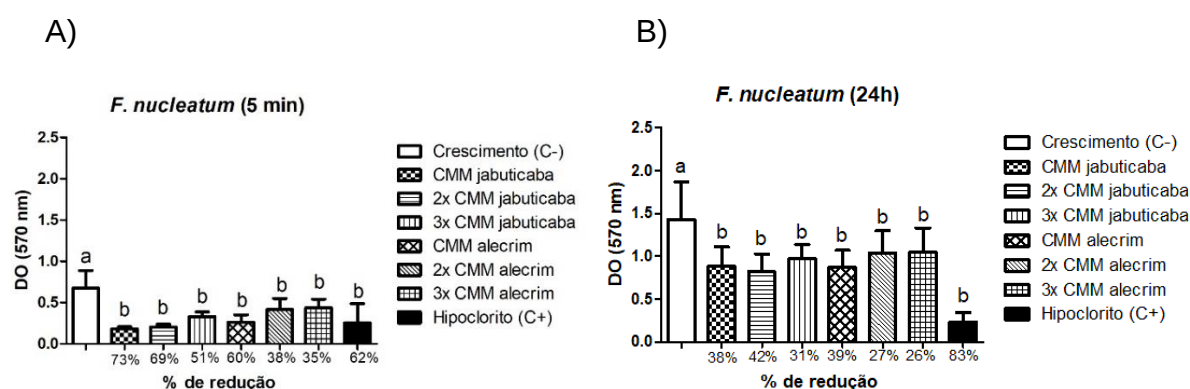
Para a cepa de *F. nucleatum* foram utilizadas concentrações dos extratos isolados, uma vez que não apresentou efeitos sinérgicos ou aditivos quando testados em combinação. Sendo as concentrações da CMM, 2x CMM e 3x CMM para ambos os extratos hidroetanólicos.

Dessa forma, para o tempo de 5 min todos os tratamentos utilizados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo

controle de crescimento. Para o extrato vegetal de jabuticaba, houve redução de 73% ($p \leq 0,05$) utilizando a concentração de 2,5 mg/mL, 69% ($p \leq 0,05$) com a concentração de 5 mg/mL e de 51% ($p \leq 0,05$) na concentração de 7,5 mg/mL de extrato isolado. Nos tratamentos feitos com extrato isolado de alecrim, houve redução de 38% utilizando a concentração de 0,1 mg/mL, 35% com a concentração de 0,2 mg/mL e de 35% na concentração de 0,3 mg/mL utilizando o extrato isolado (Figura 11A).

Para os tratamentos realizados no período de 24 h, todos os tratamentos realizados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle de crescimento. Os tratamentos com extrato isolado de jabuticaba apresentaram redução da viabilidade do biofilme de 38% ($p \leq 0,05$) utilizando concentração de 2,5 mg/mL, 42% ($p \leq 0,05$) na concentração de 5 mg/mL e 31% ($p \leq 0,05$) na concentração de 7,5 mg/mL. Para os tratamentos utilizando extrato isolado de alecrim também houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) para todas as concentrações utilizadas dos tratamentos, tendo reduzido 39% ($p \leq 0,05$) da viabilidade do biofilme utilizando a concentração de 0,1 mg/mL, 27% ($p \leq 0,05$) na concentração de 0,2 mg/mL e de 26% ($p \leq 0,05$) utilizando o tratamento com 0,3 mg/mL (Figura 11B).

Figura 11 – Tratamentos de biofilmes formados de *F. nucleatum*.



Legenda: DO – Densidade óptica; CMM - Concentração Mínima Microbicida; As letras “a” e “b” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Dunn.

Fonte: Elaborado pela autora.

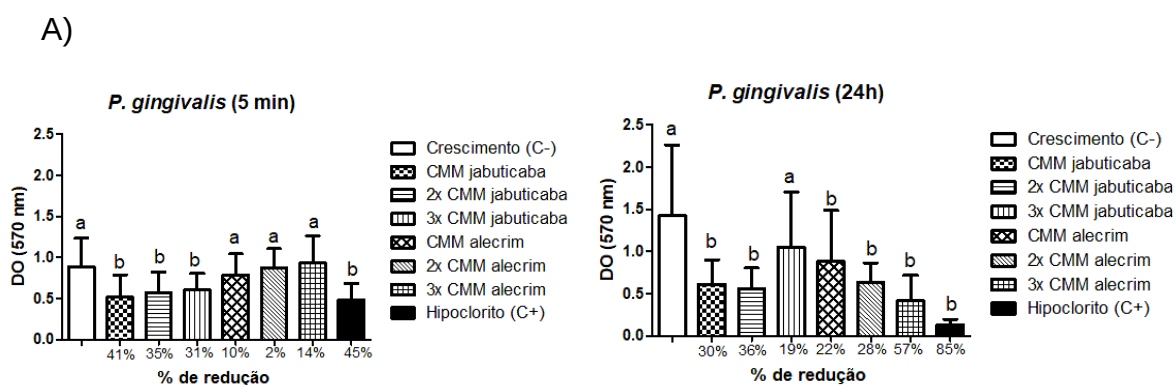
Para a cepa de *P. gingivalis*, também foram utilizadas concentrações dos extratos isolados, sendo essas a da CMM, 2x CMM e 3x CMM para ambos os extratos

hidroetanólicos.

No período de tratamento de 5 min, o extrato hidroetanólico de jabuticaba apresentou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) para todos os tratamentos utilizados em comparação ao grupo controle de crescimento. Dessa forma, o extrato de jabuticaba foi efetivo para diminuição da viabilidade do biofilme em 41% ($p \leq 0,05$) na sua concentração de 2,5 mg/mL, em 35% na concentração de 5 mg/mL e de 31% na concentração de 7,5 mg/mL, como demonstrado na Figura 12A.

Para os tratamentos aplicados no período de 24 h, ambos os extratos foram efetivos para redução da viabilidade do biofilme microbiano. Sendo assim, o extrato de jabuticaba quando utilizado isoladamente, nas concentrações de 2,5 mg/mL e de 5 mg/mL demonstraram diferença estatística ($p \leq 0,05$) com 30% e 36% de redução, respectivamente. Quando utilizado o extrato de alecrim isolado, todos os tratamentos utilizados demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com concentrações de 1 mg/mL, 2 mg/mL e de 3 mg/mL sendo o percentual de redução da viabilidade do biofilme de 22%, 28% e de 57% ($p \leq 0,05$), respectivamente (Figura 12B).

Figura 12 – Tratamentos de biofilmes formados de *P. gingivalis*.



Legenda: DO – Densidade óptica; CMM - Concentração Mínima Microbicida; As letras “a” e “b” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Dunn.

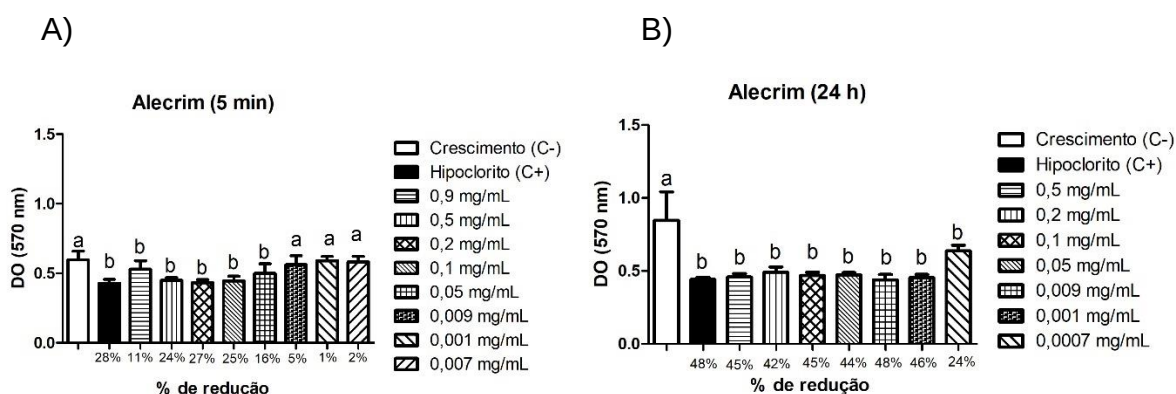
Fonte: Elaborado pela autora.

5.9 Análise da citotoxicidade dos extratos

Em relação a citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos avaliada em queratinócitos humanos (HaCat), para os tratamentos realizados com o extrato de alecrim para o período de 5 min, a maioria das concentrações foram estatisticamente semelhantes ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo tratado com hipoclorito de sódio 2,5% e as concentrações mais diluídas foram estatisticamente semelhantes ($p \leq 0,05$) ao controle celular sem tratamento, como descrito na Figura 13A.

Para o período de tratamento de 24 h, não houve diferença estatisticamente semelhante ($p \leq 0,05$) para nenhum dos grupos que receberam tratamento com o extrato de alecrim em comparação ao grupo tratado com hipoclorito de sódio 2,5% (Figura 13B).

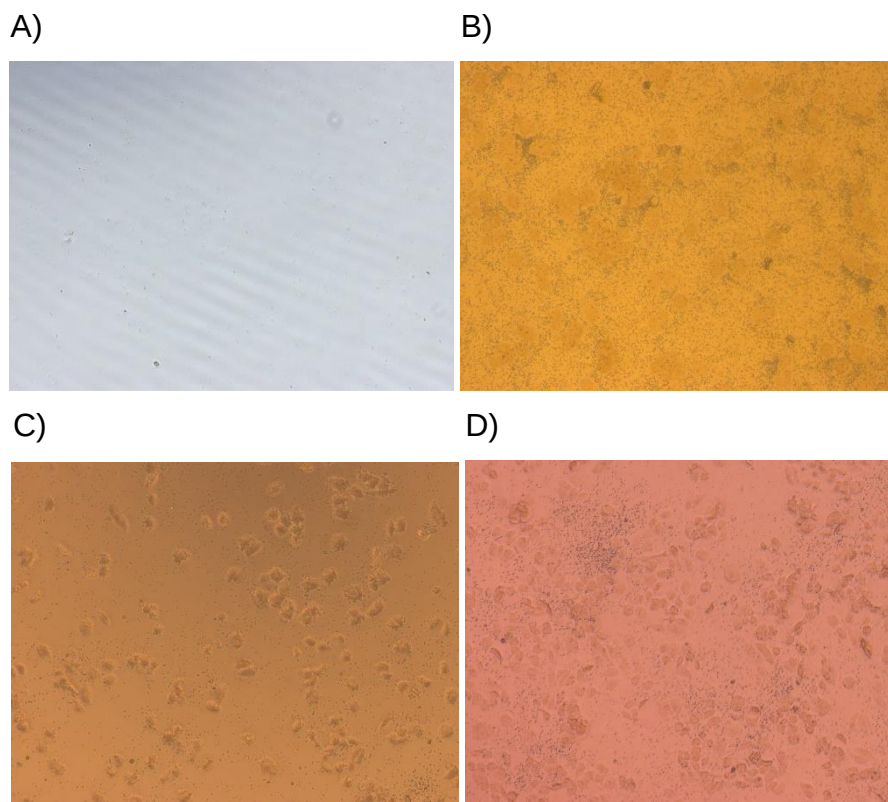
Figura 13: Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) após 5 min (A) e 24 h (B) com tratamento feito pelo extrato hidroetanólico de alecrim.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 14 pode-se fazer a comparação visual por imagens em microscópio óptico da redução de viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) com tratamentos de hipoclorito de sódio 2,5% e com extrato vegetal hidroetanólico de alecrim no tempo de 5 min.

Figura 14 - Visualização em microscópio óptico binocular da redução de viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) com tratamentos de hipoclorito de sódio 2,5% e com extrato vegetal hidroetanólico de alecrim no tempo de 5 min.



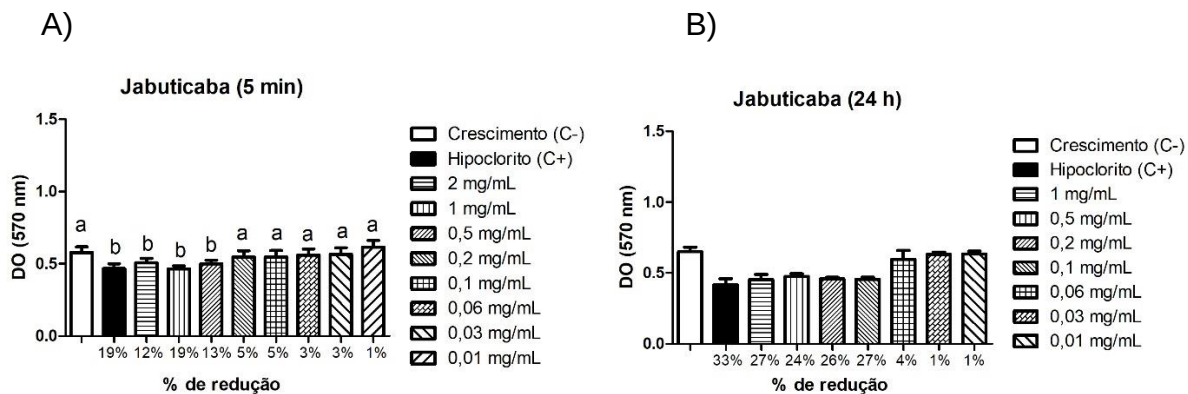
Legenda: (A) Controle com hipoclorito de sódio com aumento de 10x; (B) Concentração de 0,9 mg/mL do extrato hidroetanólico de alecrim com aumento de 20x; (C) Concentração de 0,5 mg/mL do extrato hidroetanólico de alecrim com aumento de 100x; D) Concentração de 0,2mg/mL do extrato hidroetanólico de alecrim com aumento de 100x.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o tratamento realizado com o extrato hidroetanólico de jabuticaba no período de 5 min, quando em contato com queratinócitos humanos (HaCat), houve diferença estatisticamente semelhante ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento realizado com hipoclorito de sódio 2,5% para as concentrações de 2 mg/mL a 0,5 mg/mL. Para as concentrações mais diluídas não houve diferença estatística entre os grupos tratados com extrato e o grupo controle de crescimento (Figura 15A).

Para os grupos tratados no período de 24 h, as maiores concentrações do extrato de jabuticaba (1 a 0,06 mg/mL) apresentaram concentrações com semelhança estatística ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos tratados com hipoclorito de sódio 2,5%. As concentrações mais diluídas foram estatisticamente semelhantes em relação ao crescimento celular, como descrito na Figura 15B.

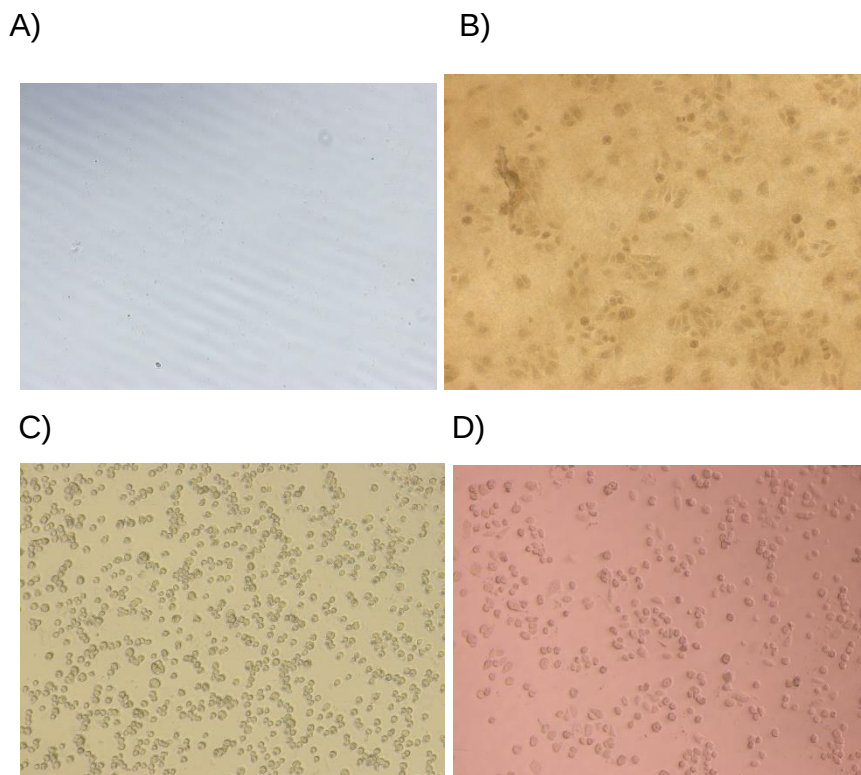
Figura 15: Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) após 5 min (A) e 24h (B) com tratamento feito pelo extrato hidroetanólico de jabuticaba.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 16 pode-se fazer a comparação visual por imagens em microscópio óptico binocular da redução de viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) com tratamentos de hipoclorito de sódio 2,5% e com extrato vegetal hidroetanólico de jabuticaba no tempo de 5 min.

Figura 16 - Visualização em microscópio óptico binocular da redução de viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat) com tratamentos de hipoclorito de sódio 2,5% e com extrato vegetal hidroetanólico de jabuticaba no tempo de 5 min.



Legenda: (A) Controle com hipoclorito de sódio com aumento de 10x; (B) Concentração de 2 mg/mL do extrato hidroetanólico de jabuticaba com aumento de 100x; (C) Concentração de 1 mg/mL do extrato hidroetanólico de jabuticaba com aumento de 100x; D) Concentração de 0,5 mg/mL do extrato hidroetanólico de jabuticaba com aumento de 50x.

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Visando pesquisar tratamentos integrativos e complementares, este estudo analisou os efeitos terapêuticos dos extratos vegetais de alecrim e jabuticaba isolados e associados frente aos microrganismos que estão envolvidos nas infecções intracanal secundárias/persistentes em culturas planctônicas e biofilmes formados, bem como analisou e identificou os componentes fitoquímicos e a citotoxicidade em culturas de queratinócitos humanos (HaCat). Tal proposta se dá para que futuramente existam outros tipos de protocolos contra infecções persistentes ou em casos de insucesso no tratamento endodôntico.

O biofilme envolvido nas infecções endodônticas pós-tratamento apresenta uma microbiota mista, porém menos diversificada, mas mais virulenta quando comparada a dentes que apresentam uma infecção endodôntica primária (Siqueira et al., 2022). Os microrganismos envolvidos no presente estudo estão baseados na literatura. O gênero *Enterococcus* ssp é uma das espécies mais prevalentes em dentes com periodontite apical secundária/persistente (Sundqvist et al., 1998; Murad et al., 2014; Henriques et al., 2016; Gomes et al., 2021). A espécie *E. faecalis* foi mais identificada em casos de doença pós-tratamento do que nos casos de infecção primária, tal qual o gênero *E. faecium* (Gomes et al., 2021; Elashiri et al., 2023). Outros microrganismos também foram identificados em altas frequências nas infecções pós-tratamento, como espécies de *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *C. albicans* (Rôças & Siqueira, 2012; Pourhajibagher et al., 2017; Zandi et al., 2018; Godoi Jr. Et al., 2023).

Sabe-se que a terapia endodôntica visa eliminar os biofilmes microbianos e seus subprodutos para restabelecer a saúde dos tecidos periapicais (Siqueira et al., 2008). Para alcançar tal objetivo o preparo biomecânico e a utilização de substâncias químicas auxiliares são de suma importância. Rôças et al. (2016) concluíram que a utilização de hipoclorito de sódio 2,5% diminuiu o número médio de células bacterianas em 44%. Em 2019, Ballal et al. Puderam perceber redução de 40% dos microrganismo na luz do canal radicular utilizando hipoclorito de sódio 2,5%. Ou seja, a irrigação exerce papel crucial no tratamento da periodontite apical, seja ela primária ou secundária/persistente e o hipoclorito de sódio é a substância mais utilizada devido ao seu potencial antimicrobiano e sua capacidade de dissolução tecidual (Tonini et al.,

2022).

A partir da extração dos extratos hidroetanólicos, identificou-se a presença de constituintes fitoquímicos responsáveis por diferentes ações terapêuticas, sendo elas as ações antibacteriana, antifúngica, antibiofilme e antioxidante. Os responsáveis por essas e muitas outras propriedades presentes nos extratos vegetais são decorrentes da presença de fenóis, flavonóides, taninos, glicosídeos, antocianinas, etc. (Dubale et al., 2023). Dessa forma, o presente estudo identificou a presença de fenóis e flavonóides totais, tanto no extrato de jabuticaba, quanto no extrato de alecrim, assim como foi realizado no estudo de Meccatti et al., 2023. Os valores de fenóis totais do EHJ 0,729 mg/mL e do EHA 0,754 mg/mL e de flavonóides de 0 mg/mL e de 0,158 mg/mL, respectivamente. No estudo de Pinc et al., 2023, a quantidade de fenóis totais para o extrato de jabuticaba foi quantificada em 0,115 mg/mL, tal diferença encontrada com o nosso estudo pode estar atribuída aos métodos de extração e solvente utilizado, o que interfere diretamente na composição química final dos extratos. No caso do nosso estudo o solvente utilizado foi hidroetanólico e o utilizado por Pinc et al. (2023) foi etanólico.

Em relação aos constituintes fitoquímicos que puderam ser identificados através do perfil cromatográfico, o estudo de Pinc et al. (2023) identificou compostos fitoquímicos como o ácido elágico, ácido gálico e ácido elágico corroborando os compostos fitoquímicos encontrados no nosso estudo realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD). Para o extrato de alecrim, o perfil cromatográfico feito por HPLC-DAD realizado por Lamponi et al. (2021) identificou compostos como o ácido clorogênico e o ácido cafeoilquínico como constituintes fitoquímicos, concordando também com os resultados do presente estudo.

Os níveis de atividade antioxidante realizado pelo mesmo estudo de Lamponi et al. (2021) pelo teste colorimétrico de Folin-Ciocalteu, demonstrou 0,777 mg/mL de atividade antioxidante, enquanto o nosso estudo apresenta valor de 0,059 mg/mL podendo justificar-se pelo fato de a região de plantio terem sido completamente distintas, com climas muito diferentes, o que influencia no solo, condições ambientais em que as plantas estão inserida, podendo influenciar diretamente nas propriedades finais dos extratos vegetais (Lamponi et al., 2021).

Não foram encontradas na literatura consultada estudos que avaliaram as propriedades antimicrobianas do extrato de jabuticaba na área odontológica, sendo

este estudo pioneiro. Porém, demonstra boa ação nos microrganismos utilizados no estudo de Chavasco et al. (2014), com exceção das cepas de *C. albicans* que só demonstraram ação quando utilizado extrato da folha da jabuticabeira. Nosso estudo utilizando extrato vegetal da casca de jabuticaba também não teve ação sobre nenhuma cepa de *C. albicans*. Em contrapartida, ação antimicrobiana do extrato de alecrim é bastante estudada na literatura e, assim como neste estudo, suas propriedades contra microrganismos resistentes são bastante significativas (Meccatti et al., 2022; Alrasheed et al., 2023). Dentro das concentrações utilizadas neste estudo, uma vez que devemos levar em consideração que se pode ter uma vasta gama de combinações de acordo com as concentrações utilizadas, os efeitos dos extratos apresentam maiores benefícios quando utilizado isoladamente.

Uma vez que não obtivemos valores relacionados a CIM por conta da coloração e sedimentos dos extratos vegetais utilizados, os valores de CMM para o extrato de alecrim variaram de 0,1 mg/mL até 2 mg/mL e de 2,5 a 5 mg/mL do extrato de jabuticaba. A partir disso, podemos perceber que baixas concentrações dos extratos foram capazes erradicar a formação das culturas planctônicas de todas as bactérias utilizadas neste estudo, pelo método de microdiluição em caldo, assim como foi utilizado no estudo de Oliveira et al. (2017).

Embora este estudo não tenha obtido valores sinérgicos na associação dos extratos, esse fato não inviabiliza a utilização dos mesmos uma vez que apresentaram resultados promissores na ação antibiofilme para as cepas envolvidas na infecção endodôntica secundária quando utilizados de forma isolada. O estudo de Dalmagro et al., (2022) corrobora com os nossos resultados obtidos, uma vez que não obtiveram valores sinérgicos dos extratos analisados, mas apresentaram uma boa atividade antimicrobiana.

Muitos estudos demonstram propriedade antibiofilme bastante promissoras dos extratos de plantas (Alam et al., 2020; Leite et al., 2020; Zeng et al., 2022). O extrato hidroetanólico de alecrim para a cepa clínica de *E. faecalis*, apresentou um percentual de redução significativo para o tratamento realizado pelo período de 24 h, tendo 40% de redução com uma concentração de 1mg/mL. Para as cepas de microrganismos anaeróbios os resultados foram bastante promissores utilizando os extratos isolados e concentrações maiores do que as achadas nas culturas planctônicas, com redução de 51%-73% nos tratamentos realizados com extrato de

jabuticaba no período de 5 min sobre cepas de *F. nucleatum* e de 35%-60% nos tratamentos realizados com o extrato de alecrim. No período de 24 h os resultados também foram bastante significativos uma vez que reduziram de 31% a 42% com o extrato de jabuticaba e de 26% a 39% com o extrato de alecrim. Sobre as cepas de *P. gingivalis* houve redução expressiva nos tratamentos feitos com o extrato de jabuticaba no período de 5 min, promovendo uma redução da viabilidade microbiana de 31%-41%. Nos tratamentos realizados pelo período de 24 h houve redução expressiva nas cepas que receberam tratamento com extrato de alecrim, tendo redução de 22%-57%.

Além de investigar efeitos terapêuticos dos extratos vegetais, é primordial analisar sua biocompatibilidade, para que existam formulações com o objetivo de agregar aos protocolos já consagrados na literatura. No estudo *in vitro* de Lorenzo-Real et al. (2019), foi concluído que o óleo essencial de *R. officinalis* L. foi citotóxico para macrófagos humanos, com efeitos prejudiciais a viabilidade celular. Já em experimentos *in vivo*, o tratamento de ferimentos em ratos diabéticos mostrou melhor reparo quando tratados com óleo essencial de *R. officinalis* L. (Abu-al-basal et al., 2010). Os extratos do nosso estudo apresentaram citotoxicidade sem diferença estatística em relação ao controle tratado com hipoclorito de sódio 2,5%. Porém, apresentaram uma menor redução percentual de viabilidade celular, ou seja, há uma melhor tolerância celular e tal achado não inviabiliza o uso dos fitoterápicos, uma vez que o hipoclorito de sódio é uma substância amplamente utilizada e consagrada pela literatura (Ruksakiet et al., 2020; Neelakantan et al., 2019; Plutzer et al., 2018).

Os resultados deste estudo são promissores, uma vez que fizemos uso de concentrações baixas dos extratos que já apresentaram resultados sobre os biofilmes avaliados, assim como no estudo de Lorenzo-Real et al. (2019). Em um segundo momento, pode-se utilizar concentrações mais altas, a fim de testarmos novas combinações e de aumentar os resultados positivos já encontrados. Como pode ser observado na literatura, há bastante relevância nos estudos que avaliam as ações terapêuticas dos extratos vegetais, mas poucos são os estudos envolvendo extratos hidroetanólicos, principalmente os envolvendo a área da endodontia.

7 CONCLUSÃO

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

a) Os extratos hidroetanólicos de jabuticaba e de alecrim produzidos apresentam em sua composição fitocompostos, como flavonóides e fenóis, ácido cafeoilquínico, galotanino, ácido clorogênico, ácido p-cumárico e quinona (EHJ) e ácido gálico, ácido p-cumárico, derivado do ácido cinâmico, ácido elágico (EHA), identificados após análise por HPLC;

b) Demonstraram importante ação antioxidante, sendo o EHA o mais potente por apresentar menor concentração de CE₅₀;

c) O extrato de alecrim apresentou ação antibacteriana em cultura planctônica para todos os microrganismos avaliados (*E. faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*). O extrato de jabuticaba apresentou ação microbicida para *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. Com relação a associação dos extratos não foi verificada ação sinérgica, mas foi verificada ação aditiva para cepa clínica de *E. faecalis* 2;

d) Na análise antibiofilme os extratos apresentaram ação antimicrobiana nos tempos de contato de 5 min e de 24 h para os microrganismos *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*;

e) Os extratos de jabuticaba e alecrim apresentaram citotoxicidade em queratinócitos humanos (HaCat) semelhante ao hipoclorito de sódio 2,5%.

REFERÊNCIAS

- Abu-Al-Basal MA. Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(2):443-450. doi:10.1016/j.jep.2010.07.007
- Abullais Saquib S, Abdullah AlQahtani N, Ahmad I, et al. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. *J Infect Dev Ctries*. 2021;15(11):1685-1693. Published 2021 Nov 30. doi:10.3855/jidc.14904
- Alam K, Farraj DAA, Mah-E-Fatima S, et al. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Infect Public Health*. 2020;13(11):1734-1741. doi:10.1016/j.jiph.2020.07.007
- Alberti A, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Fakhruddin KS, Samaranayake LP. Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021;16(7):e0255003. Published 2021 Jul 22. doi:10.1371/journal.pone.0255003
- 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.
- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1-2):239-246. doi:10.1016/s0378-8741(00)00252-x
- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig*. 2021;25(4):2017-2027. doi:10.1007/s00784-020-03510-2
- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, et al. Microbiological Investigation in Teeth with Persistent/Secondary Endodontic Infection in Different Stages of Root Canal Retreatment. *Eur Endod J*. 2020;5(3):219-225. doi:10.14744/eej.2020.73626
- Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol*. 2019;229:29-45. doi:10.1016/j.jep.2018.09.038

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;2023:8858283. Published 2023 Jan 13. doi:10.1155/2023/8858283

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.

Chavasco JM, Prado E Felipe BH, Cerdeira CD, et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(1):13-20. doi:10.1590/S0036-46652014000100002

Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*. 1992;25(2):97-106. doi:10.1111/j.1365-2591.1992.tb00743.x

de Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):5. Published 2019 Jan 9. doi:10.1186/s12929-019-0499-8

de Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(6):625-634. doi:10.1177/1535370216688571

Dioguardi M, Quarta C, Alovisei M, et al. Microbial Association with Genus *Actinomyces* in Primary and Secondary Endodontic Lesions, Review. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(8):433. Published 2020 Jul 22. doi:10.3390/antibiotics9080433

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;15:51-62. Published 2023 Feb 8. doi:10.2147/JEP.S379805

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

Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(2):e27-e31. doi:10.1016/j.tripleo.2006.02.022

Farooq A, Bilgrami A, Faraz SA, et al. Comparative evaluation of *Sapindus Mukorossi* extract with 17% EDTA on smear layer removal in various parts of the tooth root [retracted in: *J Appl Biomater Funct Mater*. 2024 Jan-Dec;22:22808000241227499]. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2023;21:22808000231166210. doi:10.1177/22808000231166210

Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. PLoS One. 2015;10(2):e0118431. Published 2015 Feb 26. doi:10.1371/journal.pone.0118431

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. J Endod. 2015;41(6):824-830. doi:10.1016/j.joen.2015.01.031

Fidelis M, Vieira do Carmo MA, Azevedo L, et al. Response surface optimization of phenolic compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments. Food Chem Toxicol. 2020;142:111439. doi:10.1016/j.fct.2020.111439

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

Gabrielli ES, Lima AR, Francisco PA, et al. Comparative analysis of bacterial content, levels of lipopolysaccharides and lipoteichoic acid in symptomatic and asymptomatic endodontic infections at different stages of endodontic treatment. Clin Oral Investig. 2022;26(1):287-302. doi:10.1007/s00784-021-03998-2

Godoi-Jr EP, Bronzato JD, Francisco PA, et al. Microbiological profile of root canals indicated for endodontic retreatment due to secondary endodontic infections or for prosthetic reasons. Clin Oral Investig. 2023;27(5):2049-2064. doi:10.1007/s00784-023-04947-x

Gomes BPFA, Francisco PA, Godoi EP Jr, et al. Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. J Endod. 2021;47(7):1075-1086. doi:10.1016/j.joen.2021.04.011

Gupta VK, Kumar MM, Bisht D, Kaushik A. Plants in our combating strategies against *Mycobacterium tuberculosis*: progress made and obstacles met. Pharm Biol. 2017;55(1):1536-1544. doi:10.1080/13880209.2017.1309440

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. Br Dent J. 2014;216(6):299-303. doi:10.1038/sj.bdj.2014.204

Hacke AC, Granato D, Maciel LG, et al. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seeds: Chemical Characterization and Extraction of Antioxidant and Antimicrobial Compounds. J Food Sci. 2016;81(9):C2206-C2217. doi:10.1111/1750-3841.13405

Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, et al. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. *J Endod*. 2016;42(8):1239-1245. doi:10.1016/j.joen.2016.05.014

Hickl J, Argyropoulou A, Sakavitsi ME, et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. 2018;13(12):e0207574. Published 2018 Dec 12. doi:10.1371/journal.pone.0207574

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20:340-349. doi:10.1016/0030-4220(65)90166-0

Kumar PS, Vidhya S, Sekar M. Depth of Penetration and Antimicrobial Activity of 5% and 10% Bamboo Salt, 2% Chlorhexidine Gel and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus faecalis* - An In Vitro Study. *Eur Endod J*. 2021;6(2):205-210. doi:10.14744/eej.2021.09709

Lamponi S, Baratto MC, Miraldi E, Baini G, Biagi M. Chemical Profile, Antioxidant, Anti-Proliferative, Anticoagulant and Mutagenic Effects of a Hydroalcoholic Extract of Tuscan *Rosmarinus officinalis*. *Plants (Basel)*. 2021;10(1):97. Published 2021 Jan 6. doi:10.3390/plants10010097

Leite KF, Martins ML, de Medeiros MM, et al. Red propolis hydroalcoholic extract inhibits the formation of *Candida albicans* biofilms on denture surface. *J Clin Exp Dent*. 2020;12(7):e626-e631. Published 2020 Jul 1. doi:10.4317/jced.56843

Li FS, Weng JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants*. 2017;3:17109. Published 2017 Jul 31. doi:10.1038/nplants.2017.109

Lorenzo-Leal AC, Palou E, López-Malo A, Bach H. Antimicrobial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1639726. Published 2019 May 7. doi:10.1155/2019/1639726

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig*. 2020;24(9):3169-3179. doi:10.1007/s00784-019-03191-6

Meccatti VM, Figueiredo-Godoi LMA, Pereira TC, et al. The biocompatibility and antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* against *Candida albicans* in *Galleria mellonella* model. *Sci Rep*. 2022;12(1):15611. Published 2022 Sep 16. doi:10.1038/s41598-022-19425-9

Meccatti VM, Santos LF, de Carvalho LS, et al. Antifungal Action of Herbal Plants' Glycolic Extracts against *Candida* Species. *Molecules*. 2023;28(6):2857. Published 2023 Mar 22. doi:10.3390/molecules28062857

Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutrients*. 2016;8(11):731. Published 2016 Nov 17. doi:10.3390/nu8110731

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

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

Neelakantan P, Herrera DR, Pecorari VGA, Gomes BPFA. Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. *Int Endod J*. 2019;52(1):19-27. doi:10.1111/iej.12963

Neves JA, Neves JA, Oliveira RCM. Pharmacological and biotechnological advances with *Rosmarinus officinalis* L. *Expert Opin Ther Pat*. 2018;28(5):399-413. doi:10.1080/13543776.2018.1459570

Nouroloyouni A, Moghaddam N, Nouroloyuni S, Milani AS, Yavari HR, Majidi AR. Molecular Identification of *Candida albicans* in Endodontic Retreatment Cases by SYBR Green I Real-time Polymerase Chain Reaction and its Association with Endodontic Symptoms. *J Dent (Shiraz)*. 2023;24(4):429-437. Published 2023 Dec 1. doi:10.30476/dentjods.2023.91706.1786

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

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

Patil V, Akal N, Biradar S, Ratnakar P, Rairam S, Batta O. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of mushroom, Aloe vera, and Curcuma longa with calcium hydroxide as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2022;25(4):415-419. doi:10.4103/jcd.jcd_208_22

Pinc MM, Dalmagro M, da Cruz Alves Pereira E, et al. Extraction Methods, Chemical Characterization, and In Vitro Biological Activities of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel

Peels. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(8):1173. Published 2023 Aug 17. doi:10.3390/ph16081173

Plutzer B, Zilm P, Ratnayake J, Cathro P. Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Aust Dent J*. 2018;63(2):208-216. doi:10.1111/adj.12580

Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res*. 2017;31:e108. Published 2017 Dec 18. doi:10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1721-1724. doi:10.1128/JCM.00531-12

Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, 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

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-1301.e3. doi:10.1016/j.joen.2008.07.028

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(5):632-641. doi:10.1016/S1079210404000046

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1):86-93. doi:10.1016/s1079-2104(98)90404-8

Thienngern P, Panichuttra A, Ratisoontorn C, Aumnate C, Matangkasombut O. Efficacy of chitosan paste as intracanal medication against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm compared with calcium hydroxide in an in vitro root canal infection model. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):354. Published 2022 Aug 16. doi:10.1186/s12903-022-02385-x

Tonini R, Salvadori M, Audino E, Sauro S, Garo ML, Salgarello S. Irrigating Solutions and Activation Methods Used in Clinical Endodontics: A Systematic Review [published correction appears in *Front Oral Health*. 2022 Mar 24;3:876265]. *Front Oral Health*. 2022;3:838043. Published 2022 Jan 31. doi:10.3389/froh.2022.838043

Ušjak 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, Silva KC, Maekawa LE, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(6):555-559. doi:10.1590/s1678-77572009000600003

Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol*. 2017;122(4):911-920. doi:10.1111/jam.13400

Weiger R, Axmann-Krcmar D, Löst C. Prognosis of conventional root canal treatment reconsidered. *Endod Dent Traumatol*. 1998;14(1):1-9. doi:10.1111/j.1600-9657.1998.tb00801.x

Zandi H, Kristoffersen AK, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Enersen M. Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing. *J Endod*. 2018;44(3):372-378. doi:10.1016/j.joen.2017.11.019

Zeng J, Chen D, Lv C, et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of *Polygonum chinense* L. aqueous extract against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2022;12(1):21988. Published 2022 Dec 20. doi:10.1038/s41598-022-26399-1

Zhang C, Yang Z, Hou B. Diverse bacterial profile in extraradicular biofilms and periradicular lesions associated with persistent apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021;54(9):1425-1433. doi:10.1111/iej.13512

Zhou W, Zhang X, Zhu CL, He ZY, Liang JP, Song ZC. Melatonin Receptor Agonists as the "Perioceutics" Agents for Periodontal Disease through Modulation of *Porphyromonas gingivalis* Virulence and Inflammatory Response. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166442. Published 2016 Nov 10. doi:10.1371/journal.pone.0166442