



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

CAROLINE TREFIGLIO ROCHA

EFEITOS ANTIMICROBIANOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lavandula dentata* SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium*

2022

CAROLINE TREFIGLIO ROCHA

**EFEITOS ANTIMICROBIANOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lavandula dentata*
SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium***

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 ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

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

Orientador: Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Rocha, Caroline Trefiglio

Efeitos antimicrobianos do óleo essencial de *Lavandula dentata* sobre cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* / Caroline Trefiglio Rocha. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.
Orientador: Claudio Antonio Talge Carvalho.

1. Endodontia. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. *Enterococcus faecium*. 4. *Lavandula dentata*. 5. Óleo essencial. I. Carvalho, Claudio Antonio Talge, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. 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. Miguel Christian Castillo Marin

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 16 de fevereiro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, **João Carlos e Eliana Trefiglio** pelo amor incondicional e por colocarem sempre a educação em primeiro lugar. Pelo exemplo como profissionais – colegas de trabalho e principalmente como pessoas.

Aos meus irmãos **Giuliana, Thiago e Raphael** por serem meus primeiros amigos. Com vocês sei que nunca estarei só.

Amo vocês!

.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me abençoar com pessoas queridas ao longo da minha caminhada. A **Nossa Senhora** que abençoou a mim e a minha família com muita sabedoria e saúde, principalmente em meio a pandemia do COVID 19, permitindo que conseguíssemos passar esse período triste na história do mundo.

Ao meus pais, **João Carlos da Rocha** e **Eliana Trefiglio Rocha** pelo amor e cuidado. Vocês que sempre batalharam por nossa educação e honestidade. Pelo apoio de sempre, por serem meu porto seguro e por enfrentar comigo diversas batalhas. Esse título também pertence a vocês. Faltam palavras para descrever minha gratidão a vocês. Muito obrigada! Amo vocês além da vida!

Aos meus irmãos, **Giuliana, Thiago e Raphael** pelo apoio, incentivo e pelas conversas sérias ou de descontração. Vocês fizeram/fazem parte da minha construção como pessoa e profissional. Nesses últimos anos nos aproximamos o que aumentou ainda mais nossos laços. Amo vocês! Ao meu cunhado, **Guilherme** pelo apoio e inspiração em seguir na pós-graduação. A minha cunhada, **Gabriela** pelas boas vibrações junto com a nossa família.

Ao meu namorado **Rafael Matoba** pelo carinho e amor. Você é o meu grande companheiro. Obrigada por sempre me incentivar independente das circunstâncias, pela atenção e por toda paciência que teve ao longo desse último ano. Sou muito grata por termos nos encontrado. Amo você! Agradeço também à sua família, seus pais **Bianca e Ulisses** e aos irmãos **Lucas e André** por me acolher em Indaiatuba, pelo carinho e conversas.

A minha tia **Sônia** e meus primos **Denni, Tammi e Daniel** pelo carinho, amizade desde sempre e por torcerem junto comigo cada etapa da minha vida. A minha afilhada **Isabela** e priminha **Maria Luiza** pela alegria que trouxe a nossa família.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador **Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

Aos **docentes** de Pós-graduação em Odontologia Restauradora pelas aulas e ensinamentos.

Ao **prof. Assoc. Cláudio Antônio Talge Carvalho** que me guiou nesses últimos 2 anos de mestrado, pela dedicação e paciência. Obrigada por sempre levar o mestrado de forma tranquila e prazerosa. Mesmo com a pandemia, conseguimos finalizar o trabalho que me fez amar a área acadêmica ainda mais. Muito obrigada, professor!

À **profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira** pela prontidão em ajudar, por disponibilizar o laboratório para que esse trabalho fosse realizado e pela convivência. Muito obrigada, professora!

Agradeço a banca examinadora por ter aceitado meu convite com prontidão. A **profa. Tit. Marcia Carneiro Valera** pelas considerações no EGQ, pelo respeito e convivência nesses últimos anos, aprendi e quero continuar aprendendo muito com a senhora. Ao **prof. Cristian Castillo** pelas palavras de incentivo e pela oportunidade de estar ao lado, você teve grande importância na minha carreira profissional na endodontia prática. A **profa. Ana Paula Martins** pelo carinho e incentivo a minha escolha de iniciar a pós-graduação. Ao meu amigo **Amjad Abu Hasna** pela disponibilidade e auxílio na pós-graduação. Ao **Lucas de Paula** pela disponibilidade de tempo e ensinamentos no laboratório. À **profa. Cris Marcucci** pelas aulas de fitoterapia e auxílio sempre que lhe solicitei ao meu trabalho.

Agradeço as minhas colegas de laboratório **Thais Cristine, Patrícia Nagai e Vanessa Meccatti** pela paciência e disponibilização de tempo. Obrigada pelo ensinamento, parte fundamental desse trabalho.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação que me acolheram no início do mestrado **Rayana Khoury, Amjad Abu Hasna, Thais Alves e Giovanna Minhoto** pela experiência e convivência. Em especial aos meus colegas que ingressaram comigo no mestrado **Gustavo Guerrero e ao Fernando Cesar** por tornarem os momentos mais alegres e que fizeram parte deste momento tão importante para nós. Obrigada pela amizade!

Aos meus colegas e amigos do InstitutoEndo, **Prof. Cristian Castillo, Patrícia Lopes, Felipe Fonseca e Amjad Abu** por dividir experiência e conhecimento muito além da endodontia.

Agradeço as minhas amigas de infância, **Marcella Bernal e Isabela Vitarelli** por vibrarem comigo esses momentos especiais e pela amizade de sempre. Minhas amigas-irmãs, vocês são fundamentais na minha vida. A minha amiga **Debora Peloggia** pelas risadas e apoio.

As minhas amigas de graduação, **Mayara Feres e Sarah Almeida** pela sólida amizade que permaneceu. Obrigada pelas experiências compartilhadas, pelas conversas e por vibrarem comigo essa e outras conquistas. Agradeço a minha amiga de cursinho e hoje colega, **Júlia Gaspar** pelo companheirismo desde antes da graduação, onde compartilhamos conquistas e derrotas.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente com esse trabalho, muito obrigada!

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

“A ciência não é uma escolha. É uma necessidade.” (Marcelo Gleiser)

Viva o SUS! Viva a ciência! Vacina salva vidas!

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Enterococcus</i> spp.....	15
2.2 Fitoterapia	16
2.3 Óleo essencial de <i>Lavandula dentata</i>	18
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Seleção das cepas bacterianas	22
4.2 Seleção do óleo essencial	23
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>L. dentata</i>	24
4.3.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	24
4.4 Avaliação da atividade antibiofilme do óleo essencial de <i>L. dentata</i>	28
4.4.1 Formação do biofilme de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	28
4.4.2 Tratamento do biofilme.....	28
4.4.3 Avaliação da atividade antibiofilme pelo teste MTT.....	28
4.5 Análise estatística	29
5 RESULTADO	30
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>L. dentata</i>	30
5.1.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de <i>L. dentata</i>	30
5.1.2 Quantificação da atividade metabólica do biofilme a partir do teste de MTT	32
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE	50
ANEXO.....	51

Rocha CT. Efeitos antimicrobianos do óleo essencial de *Lavandula dentata* sobre cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

O principal foco do tratamento endodôntico de sucesso, é a eliminação total de microrganismo, endotoxinas e biofilme bacteriano do sistema de canais radiculares. Quando há falha nesse processo, as bactérias de maior prevalência são *Enterococcus* spp. Desta forma, é evidente a necessidade de novas alternativas eficazes para erradicá-los dos canais radiculares. O uso de fitoterápicos antimicrobianos como os óleos essenciais (OEs) de plantas ganhou grande notoriedade na comunidade científica como uma alternativa muito satisfatória, além de efeitos antimicrobianos sobre diversas cepas bacterianas e fúngicas apresentam efeitos anti-inflamatório. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos antimicrobianos do OE de *Lavandula dentata* sobre cepas clínicas e cepas padrão de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus* em culturas planctônicas e em biofilme monotípico. Para isso foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *L. dentata* pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços em caldo BHI com sementeira, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, norma M7-A6 (*E. faecalis* e *E. faecium*). Para a análise da atividade antibiofilme dos microrganismos foram utilizados o teste colorimétrico de MTT nos períodos de 30 minutos e 24 horas de contato com o OE. Os dados obtidos nos testes *in vitro* apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo teste ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* (significância de 5%). Os resultados obtidos mostraram que o OE de *L. dentata* apresentou atividade antibacteriana e antibiofilme para todas as cepas testadas, com a CBM do óleo de *L. dentata* de 32%. Em relação a atividade antibiofilme do OE de *L. dentata* houve redução da carga bacteriana no período de 30 minutos e de 24 horas, este promoveu redução de até 79,25% no tratamento de 30 minutos e até 74,51% no tratamento de 24 horas. Concluiu-se que o óleo essencial de *L. dentata* apresentou atividade antibacteriana contra cepas clínicas resistente a antibióticos e cepas padrão de *E. faecalis* e *E. faecium* com concentração bactericida mínima de 32%, e atividade antibiofilme com tempo de ação de 30 minutos e 24 horas, com resultados semelhantes a clorexidina na maioria das cepas testadas.

Palavras-chave: Endodontia. *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecium*. *Lavandula dentata*. Óleo essencial.

Rocha CT. Antimicrobial effects of essential oil of Lavandula dentata on clinical strains of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

The main focus of successful endodontic treatment is the total elimination of microorganisms, endotoxins and bacterial biofilm from the root canal system. When this process fails, the most prevalent bacteria are Enterococcus spp. Thus, the need for new effective alternatives to eradicate them from root canals is evident. The use of antimicrobial phytotherapies such as essential oils (EOs) from plants has gained great notoriety in the scientific community as a very satisfactory alternative, in addition to antimicrobial effects on several bacterial and fungal strains that have anti-inflammatory effects. Thus, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the antimicrobial effects of Lavandula dentata EO on clinical and standard strains of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in planktonic cultures and in monotypic biofilm. For this, the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oil of L. dentata was determined by the microdilution technique in a 96-well plate in BHI broth with seeding, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M7-A6 (E. faecalis and E. faecium). For the analysis of the antibiofilm activity of the microorganisms, the MTT colorimetric test was used in the periods of 30 minutes and 24 hours of contact with the EO. The data obtained in the *in vitro* tests showed normal distribution and were analyzed by the ANOVA test complemented by the Tukey test (5% significance). The results obtained showed that the EO of L. dentata showed antibacterial and antibiofilm activity for all strains tested, with the CBM of L. dentata oil of 32%. Regarding the antibiofilm activity of the EO of L. dentata, there was a reduction in bacterial load in the period of 30 minutes and 24 hours, which promoted a reduction of up to 79.25% in the 30-minute treatment and up to 74.51% in the 24-hour treatment. It was concluded that the essential oil of L. dentata showed antibacterial activity against antibiotic-resistant clinical strains and standard strains of E. faecalis and E. faecium with a minimum bactericidal concentration of 32%, and antibiofilm activity with an action time of 30 minutes and 24 hours, with results similar to chlorhexidine in most strains tested.K

Keywords: Endodontic. Enterococcus faecalis. Enterococcus faecium. Essential oil. Lavandula dentata.

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico é manter ou restabelecer a saúde dos tecidos perirradiculares frente a organismos resistentes (Rôças, Siqueira, 2010). No entanto, quando há falhas no tratamento endodôntico principalmente relacionadas ao erro no controle de assepsia, na falta da identificação do canal radicular, na instrumentação inadequada ou na obturação, ocorrendo a infiltração de fluidos ricos em glicoproteínas, substrato para microrganismos, má adaptação de restauração pós tratamento endodôntico (Francisco et al., 2019; Prada et al., 2019), a consequência será a persistência de infecções endodônticas em tecidos perirradiculares.

As bactérias mais encontradas quando há falhas do tratamento endodôntico, são predominantemente Gram-positiva incluindo cocos – *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. (Gomes et al., 2008; Tennert et al., 2014) e bacilos – *Actinomyces* spp. e *Propionibacterium* spp. (Francisco et al., 2019). No entanto, a literatura aponta que *Enterococcus* spp. são mais comumente encontrados em lesões perirradiculares persistentes em porcentagem com até 77% (Kim et al., 2020; Zhang et al., 2012) causando infecções persistentes. Por essa razão os microrganismos e, em especial *Enterococcus* spp. devem ser erradicados durante o tratamento ou principalmente o retratamento endodôntico (Ferreira et al., 2015) de forma a promover saúde aos tecidos perirradiculares.

O gênero *Enterococcus* spp. habita como comensais normais no trato gastrointestinal e como um dos patógenos nosocomiais com resistência terapêutica na saúde pública, devido ao aumento de resistência desses microrganismos a antibióticos (Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Kayaoglu et al., 2011, Lins et al., 2013;). *Enterococcus* spp. descritos primeiramente por Sherman em 1937 (Kayaoglu et al., 2011), podem crescer entre 10 °C a 45 °C, com pH alcalino 9,6 e sobrevivem por 30 minutos a uma temperatura de 60 °C, além de ser Gram-positiva e anaeróbia facultativa, tem a capacidade de tolerar ou se adaptar a condições/ambientes desfavoráveis a outras bactérias tornando-se uma vantagem para este microrganismo. No estudo realizado por Andrade et al. (2011), foi analisada a predominância de *Enterococcus* spp. em 35 canais radiculares com necrose pulpar. Foi encontrado 94% de infecções com *E. faecalis* e 3% com *E. faecium*. Tal

predominância de *Enterococcus* spp. pode estar relacionada a mecanismos de resistências, devido a produção de enterocinas e citolisinas que são inibidoras do crescimento de outros microrganismos (Gao et al., 2016), bem como, sobrevivem (i) em ambientes com nutrientes escassos (Ferreira et al., 2015; Murad et al., 2014) e (ii) a ação de medicações intracanaís no sistema de canais radiculares (Kayaoglu et al., 2011) devido a bomba de prótons que protege o citoplasma bacteriano do pH que confere essas medicações como o hidróxido de cálcio (Andrade et al., 2011).

Lins et al. (2013), demonstraram em suas pesquisas susceptibilidade antimicrobiana de todos os isolados endodônticos de *Enterococcus* spp., bem como, alta prevalência de resistência à tetraciclina em aproximadamente 70%. No estudo posterior, Lins et al. (2019) concluíram que 29 cepas de *E. faecalis* de três diferentes países (Brasil, Japão e Reino Unido) apresentam alta incidência de genes de resistência à tetraciclina. Acreditam que as condições nos canais radiculares podem ser responsáveis por selecionar cepas resistentes e com determinados fatores de virulência (Lins et al., 2013; 2019). A formação do biofilme por *Enterococcus* spp. no sistema de canais radiculares é altamente resistente à medicação intracanal (hidróxido de cálcio) e pode alterar a resposta imune do hospedeiro. A incapacidade de remover o biofilme do sistema de canais radiculares torna-se um fator causador para a persistência de lesão perirradicular (Ghorbanzadeh et al., 2020).

A forma mais eficaz para a redução de biofilme microbiano e de endotoxinas é o preparo biomecânico (Cavalli et al., 2017). Tem como objetivo remover os microrganismos e seus subprodutos que serão alcançados por meio da ação dos instrumentos sobre a parede infectada, levando à desintegração do biofilme intracanal (Cavalli et al., 2017). As substâncias químicas auxiliares devem apresentar propriedades adequadas para este fim e, na endodontia, a solução química auxiliar mais utilizada é o hipoclorito de sódio (NaOCl) (Iqbal, 2012), que apresentam propriedades de dissolução tecidual (microbiano e orgânico) (Taylor, 1918), no entanto apresenta alta toxicidade aos tecidos perirradiculares principalmente quando em altas concentrações. Uma alternativa para a irrigação do canal radicular é o digluconato de clorexidina a 2% um excelente antisséptico e com comprovação pela literatura de sua eficácia em controle químico do biofilme em paciente com doença periodontal (Manthena et al., 2015). Apresenta efeitos bacteriostático e bactericida, e devido a propriedade de substantividade, o irrigante adere nas paredes de dentina

resultando em uma ação prolongada antimicrobiana no sistema de canais radiculares (Okino et al., 2004). No entanto, não promove dissolução de tecido orgânico, sendo uma desvantagem para este medicamento (Okino et al., 2004). Na revisão de literatura e metanálise de Ruksakiet et al. (2020) concluíram que tanto a clorexidina como o hipoclorito de sódio reduzem a carga microbiológica dos canais radiculares, no entanto, não a eliminam completamente.

O uso da medicação intracanal pode auxiliar na redução de *Enterococcus* spp. (Valera et al., 2009). O hidróxido de cálcio é a medicação padrão ouro, com diferentes veículos (aquoso, viscoso e oleoso). Seu mecanismo de ação é a liberação de íons hidroxila (-OH), conseqüentemente o aumento do pH, e inativação de enzimas na membrana citoplasmática de bactérias, alterando o transporte de nutrientes e químico, causando, portanto, efeito tóxicos em bactérias que não sobrevivem ao ambiente alcalino (Siqueira, De Uzeda, 1996). Tal formação ocorre devido a genes de virulência envolvidos na aderência de bactérias, na formação e desenvolvimento do biofilme (Ghorbanzadeh et al., 2020).

A busca de alternativas por recursos naturais nos tratamentos terapêuticos utilizados tanto na medicina como na odontologia, tem evoluído de forma expressiva (Uday Mohan et al., 2016). Por consequência do uso indiscriminado da antibioticoterapia, há uma ameaça constante de microrganismos resistentes a substâncias utilizadas pela medicina tradicional que, no passado, eram capazes de erradicá-las, no mundo contemporâneo, é um desafio ao sistema de saúde pública (Dadgostar, 2019) diante dos altos custos demandados para produção de medicamentos que tratam essas infecções, torna-se inviável, a longo prazo, a manutenção destas terapias tradicionais. As bactérias que apresentam maior resistência aos medicamentos são conhecidas como ESKAPEE, um acrônimo para os microrganismos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli* (Yu et al., 2020). Uma possível alternativa a essas bactérias multirresistentes são as plantas medicinais (extratos e óleos essenciais). Há diversos achados literários de atividade antimicrobiana, como alternativa de novas substâncias medicinais capazes de tratar infecções (Łysakowska et al., 2015; Mendes et al., 2017,).

Os óleos essenciais são conhecidos por danificar a estrutura das membranas celulares levando ao defeito e morte celular dos microrganismos (Insawang et al., 2019). A literatura apresenta estudos de óleos essenciais com ação antifúngica (Karpiński et al., 2021), ação antimicrobiana (Co et al., 2019; Guandalini Cunha et al., 2020; Łysakowska et al., 2015; Mendes et al., 2017; Moore et al., 2016), atividade nematicida (Barbosa et al., 2010), bem como são eficazes em tratamento de infecções bacterianas que são resistente a antibiótico (Cavanagh, Wilkinson, 2002). Alguns estudos mostram o uso de óleos essenciais na odontologia, são utilizados como alternativa para enxaguantes bucais (Kamath et al., 2020), para a redução do progresso de cárie precoce (Ma et al., 2020) e como antimicrobiano para *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (Raheem et al., 2019).

Dentre a variedade de plantas medicinais, o gênero da *Lavandula* pertence à família *Lamiaceae*, com 28 espécies diferentes se destaca há séculos na indústria cosmética e por seus efeitos terapêuticos (Cavanagh, Wilkinson, 2002). Seus efeitos terapêuticos variam de acordo com a concentração dos compostos presentes em suas espécies, como cânfora, terpinen-4-ol, linalol, acetato de linalila, beta-ocimeno e 1,8-cinelol (Ali et al., 2015; Bouazama et al., 2017; Giuliani et al., 2020; Justus et al., 2018). Foi constatado na literatura científica que o gênero da *Lavandula* fornece óleo essencial com diversos princípios ativos, como sedação, ação antiespasmódicas, antibacteriana antifúngica (Karpiński et al., 2021), antioxidante (Almohawes, Alruhaimi, 2020), propriedades acaricidas (Perrucci et al., 1996)

Dentre as espécies, destacamos a *Lavandula dentata*, um pseudo-arbusto com folhas estreitas e com bordas dentadas, suas flores apresentam-se azuladas curtas e densas (Bouazama et al., 2017). Sua origem é no sul e leste da Espanha, noroeste da África, Etiópia, Eritreia, Israel, Jordânia e Península Arábica. Atualmente é cultivada em vários lugares do mundo, isso porque sua estação de floração ocorre no inverno e tem prolongada duração (Giuliani et al., 2020). O óleo essencial de *L. dentata*, de acordo com a literatura, apresentou (i) atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* (Müller-Sepúlveda et al., 2020); (ii) erradicou cepas fúngicas de *Curvularia spicifera* (Moumni et al., 2021); (iii) reduziu cepas *S. cucurbitacearum*; apresentou ação (vi) anti asma; anti-inflamatória; hipolipemiante; antioxidante, hipoglicêmica (Almohawes, Alruhaimi, 2020) e atividade antimicrobiana, contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas (Bouazama et al., 2017; Justus B, et al., 2018). Por

fim, também, apresentou atividade antidiabética, anti-hipertensiva, antiprotozoária, antisséptica (Giuliani et al., 2020). Diante dos comprovados benefícios acerca do tema, verifica-se que há reduzido número de estudos científicos publicados sobre uso terapêutico de óleo essencial de *L. dentata*.

Diante disso, o uso de medicações fitoterápicas têm apresentado grande potencial de servir como parte de formulações alternativas nas infecções endodonticas principalmente as lesões persistentes, prevenindo doenças bucais relacionadas a infecções endodônticas e sistêmicas.

Com base no exposto, essa pesquisa tem o propósito de determinar *in vitro* a capacidade antimicrobiana do óleo essencial de *Lavandula dentata* contra cepas isoladas e biofilme de bactérias *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. A fim de servir como parte de formulações alternativas, prevenindo doenças bucais relacionadas a infecções endodônticas e sistêmicas, além de apresentarem baixo custo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterococcus* spp.

Dentre os mecanismos de resistência de *Enterococcus* spp., pode-se citar fatores de virulência, formação de biofilme, interação bactéria-célula do hospedeiro. No estudo de Stępień-Pyśniak et al. (2019), verificaram-se que as cepas de *E. faecalis* mostraram maior hidrofobicidade do que as cepas de *E. faecium*, uma vez que a hidrofobicidade da superfície celular bacteriana é importante para a interação entre bactéria e a célula do hospedeiro. Esse achado explicaria a maior ocorrência de *E. faecalis* em sistema de canais radiculares.

Além disso Xu et al. (2019), pesquisaram onde identificaram os efeitos da irrigação e instrumentação em dentinas infectadas com *E. faecalis* e concluíram que esses procedimentos alteram a aderência inicial de *E. faecalis* à dentina do canal radicular e as propriedades da superfície da dentina. O número crescente de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos tem se tornado uma ameaça mundial à saúde, se destacando dentre estas *E. faecalis* e o *E. faecium* (Paulsen et al., 2003; Roca et al., 2015).

No estudo de Lins et al. (2013) foi realizado uma coleta da microbiota intracanal com cone de papel estéril de 43 pacientes com infecção endodôntica primária, no qual detectou-se 20 isolados de *Enterococcus* spp. desses pacientes. Para determinar o perfil de resistência aos antibióticos do isolado de *E. faecalis* utilizou-se o método de ágar diluição e observou-se alta incidência (70%) de resistência a tetraciclina.

Na pesquisa de Barbosa-Ribeiro et al. (2016), foram selecionados 30 pacientes que apresentavam tratamento endodôntico realizado com periodontite apical no exame radiográfico, com desconforto à percussão vertical e persistência dos sintomas à palpação. Realizou-se a desobturação e então coletaram com pontas de papel estéreis a microbiota do canal radicular. Observaram que em 100% dos canais havia *E. faecalis*. Ao realizarem o teste antimicrobiano com antibióticos observaram vários graus de sensibilidade das cepas, e o tratamento com amoxicilina + clavulanato

de potássio foi o mais efetivo. Relataram também que há necessidade de avaliação periódica da suscetibilidade aos antibióticos, a fim de elucidar as mudanças no perfil de resistência dessas bactérias.

Outro estudo *in vitro* em 2019, experimentou alternativas de tratamento endodôntico para desinfecção do canal radicular contra cepas isoladas padrão *E. faecalis* e *Streptococcus mutans*. Cinco tratamentos: G1- laser de diodo, G2- fotoativação com azul de metileno, G3- NaOCl, G4- NaOCl à 3 % + laser de diodo e G5- NaOCl 3% + fotoativação com azul de metileno e um grupo controle. Concluíram que o G4 (NaOCl à 3 % + laser de diodo) e G5 (NaOCl 3% + fotoativação com azul de metileno) apresentaram maior redução de carga bacteriana (98%) quando comparada com os grupos que não obtiveram associação do tratamento associado (Sarda et al., 2019).

Uma outra alternativa de tratamento, testaram duzentos e vinte dentes extraídos, os quais foram contaminados com cepa padrão de *E. faecalis* e *C. albicans*. Para o tratamento utilizaram NaOcl (1%, 3% e 5%), clorexidina (CHX) (0,2% e 2%) e ozônio (24s, 60s, 120s, 180s), bem como hipoclorito de sódio 5% + ozônio 180s e clorexidina 2% e ozônio 24s. Concluíram que a ação combinada de CHX 2% + ozônio 24s eliminou completamente os microrganismos estudados (Noites et al., 2014).

No estudo de Liu et al. (2020), uma outra alternativa de tratamento *in vitro* a fim de erradicar *E. faecalis*. Utilizaram o ácido 3-fenilático, ácido orgânico que apresenta atividade antibacteriana de amplo espectro. Concluíram, portanto, que em diferentes concentrações houve efeito de controle de biofilme da cepa padrão de *E. faecalis*.

2.2 Fitoterapia

O uso de plantas medicinais e óleos essenciais têm sido altamente estudado na última década devido ao aumento de microrganismos resistentes a antibióticos. Em uma pesquisa *in vitro*, Bertolini et al. (2012), verificaram a diminuição de *Streptococcus mutans* nas cerdas de escovas de dentes quando utilizado a própolis e *Aloe vera* como dentífrico sem diferença estatística com produtos industrializados.

Avaliaram em outro estudo Dias-da-Silva et al. (2013), histologicamente o efeito do óleo de copaíba na cicatrização de feridas alveolares em mandíbulas de ratos com duas formas de administração, irrigação tópica e sistêmica e concluíram que o uso da resina do óleo de copaíba pode promover melhores resultados após intervenções orais, devido ao aumento da neoformação óssea.

De acordo com Łysakowska et al. (2015), o óleo essencial de gerânio em diferentes concentrações foi eficiente contra vinte e uma cepas isoladas e de biofilme de *Enterococcus faecalis* que mostraram resistência a diversos antibióticos.

Hickl et al. (2018) concluíram que plantas mediterrâneas, incluindo as folhas do alecrim, apresentaram efeito significativo antimicrobiano contra *Streptococcus mutans*. O extrato da planta apresentou ação antibiofilme, uma vez que reduziu as taxas de biofilme monomicrobianos de *E. faecalis*, *S. mutans*, *C. albicans* e *Pseudomona aeruginosas* e também em biofilmes poli microbianos com *C. albicans*, podendo ser eficiente na prevenção da aderência de biofilmes na superfície de dentes, aparelhos ortodônticos, mucosa oral e próteses (De Oliveira et al., 2019).

Em concordância com os efeitos da fitoterapia na endodontia, Raheem et al. 2019 descreveram a utilização da própolis egípcia nanoparticulada para o selamento de canal radicular, caracterizando tal material com atividade antimicrobiana em bactérias de *E. faecalis* e *S. mutans*, além de atividade antifúngica contra *C. albicans*. Em um ensaio clínico randomizado duplo cego Shabbir et al. (2020), concluíram que a pasta de própolis chinesa utilizada como medicação intracanal mostrou propriedades semelhantes ao hidróxido de cálcio quando comparada ao nível de dor pós-operatória em dentes que respondiam negativamente ao teste elétrico e ao teste de vitalidade pulpar, caracterizados como dentes necrosados.

No estudo de Oliveira et al. (2017), o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou efeito bacteriostático e bactericida contra cepas isoladas de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus mutans*, bem como atividade antimicrobiana promissora contra bactérias cariogênicas em biofilmes na superfície do esmalte. Corroborando com esse estudo, Tofiño-Rivera et al. (2016) demonstraram em um trabalho científico *in vitro* a redução de 95% da atividade do biofilme do *S. mutans* tanto com o *C. citratus* como *Lippia alba* uma alternativa econômica para produtos químicos para o controle da cárie dentária. O estudo *in vivo* de De Oliveira et al. (2019) demonstrou diminuição na contagem de *Staphylococcus aureus* em feridas do dorso de ratos quando comparada

ao uso de óleo essencial de *C. citratus* com o grupo controle. Em concordância com a atividade antimicrobiana, no estudo de Co et al. (2019) houve diminuição na formação de hifas e pseudohifas em *Candida* spp., demonstrando que o fitoterápico poderia ser útil para infecções cutâneas. Também, o óleo essencial de *C. citratus* apresentou valores maiores de concentração inibitória mínima (MIC) contra bactéria gram-negativas (*Moraxella catarrhalis* e *Escherichia coli*) do que em gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e leveduras (*Candida tropicalis* e *Candida albicans*).

Outro estudo *in vitro* que corrobora com a eficiência de óleos essenciais, foi o de Guandalini Cunha et al. (2020), que teve como proposição comparar o óleo essencial de citronela em diferentes concentrações com dois enxaguantes bucais de marcas comerciais sem álcool contra cepas *S. aureus* (ATCC 14458) e *C. albicans* (ATCC 26790) em dois tipos de superfície diferente (resina acrílica e liga de níquel cromo, bem como avaliar a citotoxicidade das soluções. Como conclusão as concentrações do enxaguatório bucal à base de óleo essencial de citronela apresentou maior efeito antibiofilme e que após a diluição seriada a citronela apresentou menor efeito citotóxico, com concentração de 0,13% de óleo essencial apresentando mais de 70% de viabilidade celular, quando comparados com as soluções comerciais.

Também foi encontrado na literatura alguns estudos que avaliam a eficácia de diferentes óleos essenciais sobre cepas de *Enterococcus* spp. O estudo de Fisher, Phillips (2009) avaliou o mecanismo de ação da mistura de óleo essencial de bergamota e laranja sobre cepas de *E. faecalis* (NCTC 12697) e *E. faecium* (NCTC 07171) na forma de óleo e a vapor. Realizaram ensaio de permeabilidade de membrana NPN, avaliaram a concentração intra e extracelular de ATP, o potencial de membrana, determinaram o pH intracelular e concluíram que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser devido a absorção da mistura pelas células enterocócicas causando a permeabilidade à membrana celular e assim reduzindo a síntese de ATP, não foi encontrado se o mecanismo de ação do óleo essencial a vapor causou o mesmo danos às membranas celulares.

2.3 Óleo essencial de *Lavandula dentata*

Devido a quantidade de óleo essencial encontrados mundialmente, a *Lavandula dentata* apresenta poucos estudos na literatura, potencializando estudos que comprovem seus efeitos terapêuticos. A revisão de literatura de Karpiński et al. (2021) sobre os extratos e óleos essenciais que apresentavam atividade contra biofilme de *Candida* spp. Dentre os óleos essenciais e extratos encontrados na literatura, o óleo de *Lavandula dentata* apresentou efeito antibiofilme contra esse microrganismo, sendo potencial alternativa de droga antifúngica, em especial em casos de bactérias resistentes e multirresistentes.

Bouazama et al. (2017) estudaram a composição química de *Lavandula dentata* e *Lavandula pendunculata*, bem como atividade antimicrobiana contra cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fasciens*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), relataram que essa ação pode ser atribuída à presença de cânfora e trans pinocarveol para *L. dentata*.

Em estudo realizado em 2020 *in vivo*, a análise sanguínea de porquinhos-da-Índia machos adultos induzindo asma com ovalbumina após a realização do tratamento utilizando a terapia por via oral com extrato de *L. dentata* por 21 dias, terapia oral com extrato de *L. dentata* do 3º dia ao 23º dia e tratado com Tween 80 por 21 dias e dos grupos controle. O extrato de *L. dentata* apresentou atividade anti asma, antiinflamatório, hipolipemiante, antioxidante e atividade hipoglicêmica (Almohawes, Alruhaimi, 2020).

Alguns óleos essenciais podem apresentar efeito positivo contra pragas na agricultura orgânica. O estudo *in vivo* de (Moumni et al., 2021) avaliou sete óleos essenciais contra microrganismos comuns em sementes de abóbora. O óleo de *L. dentata* nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL reduziram 89,3% de *Alternaria alternata*, 89,4% de *Fusarium fujikuroi*, 100% de *Curvularia spicifera*, 82,8% de *Paramyothecium roridum* 77,4% de *Rhizopus stolonifer* e também de *Fusarium solani*. Como resultado o óleo essencial de *L. dentata* pode apresentar ação antifúngica em oplantações agrícolas.

Em um estudo realizado por uma equipe brasileira de pesquisadores (Justus et al., 2018), avaliou a composição química e a atividade do óleo essencial de *Lavandula dentata* cultivado no Brasil. O principal composto encontrado foi o 1,8-

cineol (63,25%) seguido de isolimoneno (6,96%). Na avaliação da atividade antimicrobiana observaram que houve inibição do crescimento bacteriano *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *Streptococcus pyogenes*, no entanto a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou menor sensibilidade ao tratamento.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Lavandula dentata* sobre seis cepas clínicas resistentes a antibióticos e uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, em culturas planctônicas e biofilmes monotípicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das cepas bacterianas

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas cepas clínicas de *E. faecalis* e de *E. faecium* isoladas de dentes com infecções endodônticas que foram coletadas para o estudo de Santos (2014). As cepas identificadas foram isoladas e armazenadas em *Eppendorf* contendo 80% de BHI e 20% de glicerol, no freezer -80 °C, no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT/UNESP), as mesmas já foram previamente cadastradas no SisGen. As cepas foram identificadas pelo método de cadeia de polimerase (PCR) multiplex.

Como microrganismos controle para todos os experimentos subsequentes, utilizaram cepas padrão cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, sob registros *E. faecalis* (ATCC 4083) e *E. faecium* (ATCC 6569) as quais já estão previamente cadastradas no SisGen.

4.2 Seleção do óleo essencial

Para a avaliação microbiológica foi utilizado o óleo essencial de *Lavandula dentata* (Lavanda Brasil) com concentração de 100% foi obtido da empresa WNF INDÚSTRIA E COM. (São Paulo, SP), com os devidos laudos e especificações (Anexo A).

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. dentata*

A atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de *Lavandula dentata* foi

avaliada sobre 4 cepas clínicas e 1 cepa-padrão de *E. faecalis* e sobre 2 cepas clínicas e 1 cepa-padrão de *E. faecium*.

4.3.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *L. dentata*

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial para cada cepa microbiana, os testes foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, norma M7-A6.

O óleo essencial de *Lavandula dentata* foi diluído em *Tween 20* na concentração de 0,05%. A concentração do *Tween 20* foi alcançada através da diluição em meio de cultura *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai, Índia). Com o *Tween 20* de 0,05% diluiu-se o óleo essencial obtendo a concentração desejada.

O teste foi realizado em microplacas, onde adicionaram 100 µL de meio de cultura, caldo *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai, Índia), e 100 µL de óleo essencial no primeiro poço da microplaca, de onde partiu uma série de 10 diluições seriadas. As concentrações finais podem ser observadas no quadro 1.

Quadro 1 – Diluição seriada do óleo essencial

ÓLEO ESSENCIAL	DILUIÇÕES DOS FÁRMACOS									
<i>Lavandula dentata</i>	32%	16%	8%	4%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a diluição seriada do óleo essencial, a suspensão microbiana foi preparada. Para isso *E. faecalis* e *E. faecium* foram cultivadas separadamente em

ágar BHI por 24 h e no momento da padronização cada suspensão bacteriana foi padronizada em solução fisiológica em 10^6 UFC/ml do espectrofotômetro. Após a padronização foi adicionado alíquotas de 100 μ L de cada suspensão microbiana, em todos os poços. Este teste foi realizado em duplicata.

Como controles de esterilização utilizamos o meio de cultura (*Muller Hinton*) e também meio de cultura (*Muller Hinton*) com *Tween 20* a 0,05%. Como controles negativos utilizamos meio de cultura (*Muller Hinton*), com *Tween 20* a 0,05% com suspensão microbiana, e também meio de cultura (*Muller Hinton*) com suspensão microbiana (Figura 1).

Figura 1 - Apresentação da distribuição do ensaio na placa de Petri de 96 poços

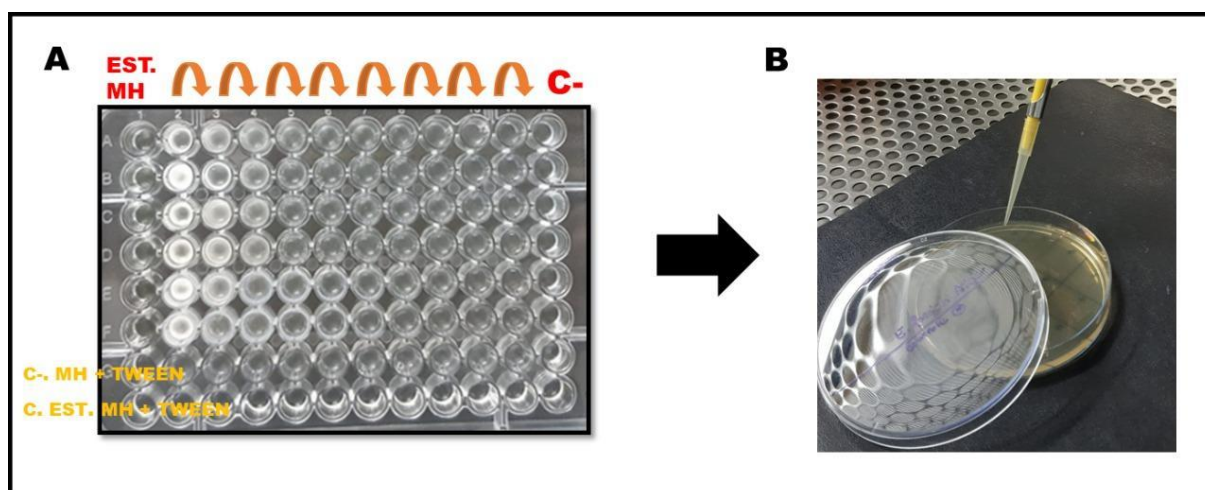


Legenda: (Est. MH) – Controle de esterilidade com meio de cultura. (C-) - controle negativo (meio de cultura + tween20 + óleo essencial + suspensão microbiana). (C- MH+TWEEN) – Controle negativo com meio de cultura+ tween20+ suspensão microbiana. (EST. MH+TWEEN) – Controle de esterilidade com meio de cultura e tween20.

Fonte: elaborada pela autora.

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do OE de *L. dentata*, foram semeados 100 μ L em placas de Petri contendo ágar BHI, que foram previamente demarcadas de acordo com as posições das diluições do OE de *L. dentata* (Figura 2).

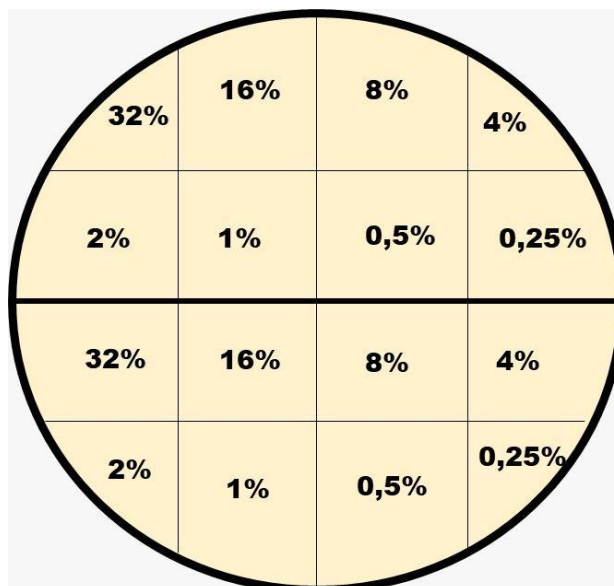
Figura 2 - Representação do CBM



Legenda: A) representa o método utilizado para realizar as diluições decimais em placas de 96 poços; B) representa as placas com o óleo em diluições seriadas para serem incubadas por 24 h a 37 °C. Fonte: Elaborada pela autora.

Após 48 h de incubação, a CBM do óleo essencial para cada cepa bacteriana (clínicas e padrão) foi determinada onde não foram observados crescimento de colônias (Figura 3). Este teste foi realizado em duplicata.

Figura 3 - Representação da disposição das concentrações na placa de Petri



Legenda: Concentrações do OE. de *L. dentata*.

Fonte: elaborada pela autora

4.4 Avaliação da atividade antibiofilme do óleo essencial de *L. dentata*

4.4.1 Formação do biofilme de *E. faecalis* e *E. faecium*

Os biofilmes foram formados de acordo com De Oliveira et al. (2019) as suspensões bacterianas foram semeadas em placas de Petri com ágar BHI.

Para a formação do biofilme, foram adicionados em placas de micro titulação de 96 poços, 100 µL de caldo BHI e 100 µL de cada suspensão bacteriana padronizada em solução fisiológica padronizada em 10^7 UFC/ml. Posteriormente as placas foram incubadas sem agitação por 48 h a 37 °C, o meio de cultura foi substituído a cada 24 h para manter os nutrientes necessários para as células.

Após esse período de incubação, os poços foram lavados três vezes com solução fisiológica estéril para remoção de bactérias não aderentes. Células que permaneceram aderidas à superfície foram consideradas verdadeiros biofilmes.

4.4.2 Tratamento do biofilme

Após o período de 48h de incubação do biofilme, eles foram colocados em contato com o OE de *L. dentata*, separadamente, por dois períodos diferentes: 30 min e 24 h. As concentrações do OE de *L. dentata* foram obtidas no ensaio de CBM realizado anteriormente.

Foram incluídos neste ensaio o controle de esterilidade (controle negativo) apenas com meio de cultura, e controle negativo com meio de cultura com biofilme e controle de tratamento de clorexidina 2%.

Após os tratamentos, a atividade antibiofilme do óleo essencial foi avaliada pela atividade metabólica dos microrganismos pelo teste MTT (Zhou et al., 2016).

4.4.3 Avaliação da atividade antibiofilme pelo teste MTT

Para análise da atividade metabólica das bactérias pelo teste de MTT, os poços foram lavados uma vez com solução fisiológica e adicionados 200 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) nos poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h em estufa a 37 °C.

Após esse período, a solução de MTT foi retirada e adicionados 200 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de incubação a 37 °C por 10 min e agitação em *shaker* por mais 10 min. Após, as densidades ópticas (DO) foram lidas em leitora de microplaca em 570 nm e convertidas em percentual de atividade metabólica dos microrganismos pela fórmula:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = \frac{\text{DO Grupo Tratado} \times 100}{\text{Média DO Grupo Controle}}$$

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes *in vitro* obtiveram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey*, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

5 RESULTADO

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. dentata*

5.1.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *L. dentata*

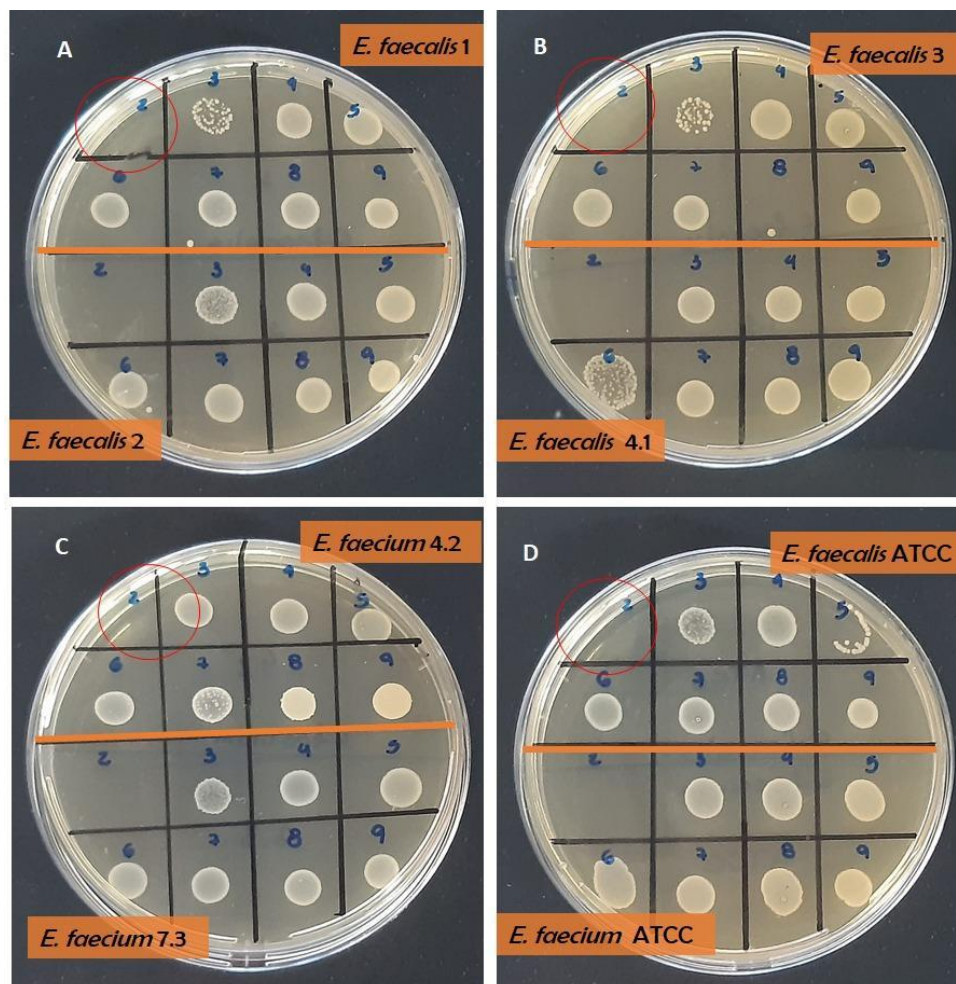
As cepas clínicas, assim como as cepas padrão, foram submetidas ao teste de sensibilidade ao óleo essencial de *L. dentata* por meio do teste de micro diluição em caldo. O óleo essencial de *L. dentata* inibiu o crescimento das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em concentração a partir de 32% (Quadro 2 e Figura 4)

Quadro 2 - Susceptibilidade de *E. faecalis* e *E. faecium* sobre *L. dentata*

<i>Enterococcus</i> spp	Óleo essencial de <i>Lavandula dentata</i> (CBM)
<i>E. faecalis</i> 1	32%
<i>E. faecalis</i> 2	32%
<i>E. faecalis</i> 3	32%
<i>E. faecalis</i> 4.1	32%
<i>E. faecalis</i> ATCC	32%
<i>E. faecium</i> 4.2	32%
<i>E. faecium</i> 7.3	32%
<i>E. faecium</i> ATCC	32%

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 4 - Análise de CBM em cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

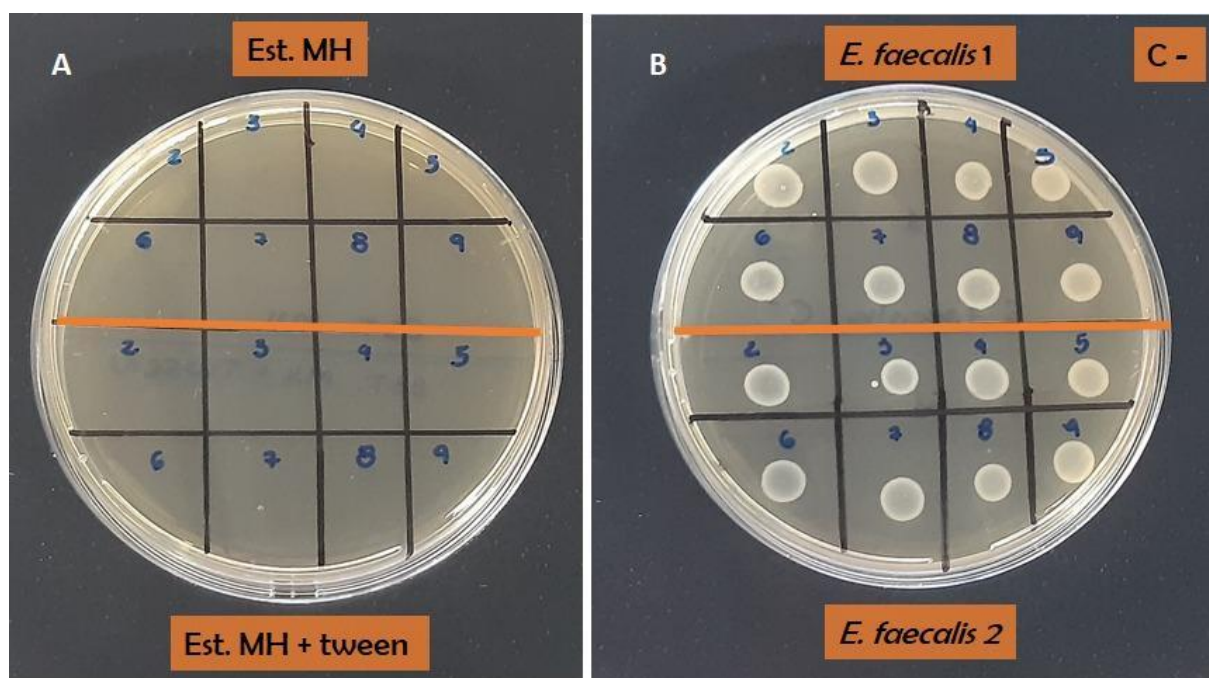


Legenda: A e B – Cepas clínicas de *E. faecalis*; C – Cepas clínicas de *E. faecium*; D - cepas padrão (ATCC) de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi realizado o controle de esterilidade do BHI+Tween20 e o controle negativo (Figura 5).

Figura 5 - Análise de esterilidade e de controle negativo



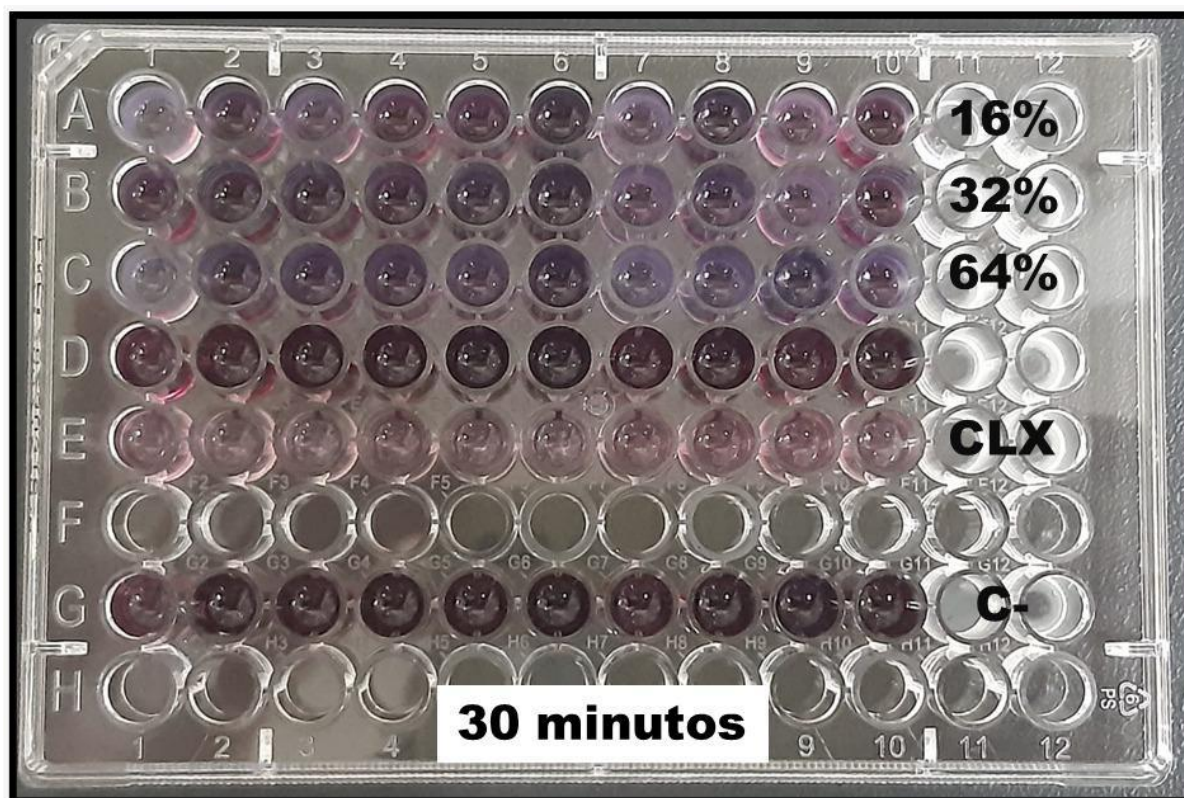
Legenda: A – (Est. MH): controle de esterilidade com *Muller Hinton*; (Est. MH+tween): controle de esterilidade com *Muller Hinton* adicionado Tween20 0,05%. B – Controle negativo (C-) em cepas clínica de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Quantificação da atividade metabólica do biofilme a partir do teste de MTT

Todas as concentrações (16%, 32%, 64%) de óleo essencial de *L. dentata* reduziram significativamente o biofilme de *E. faecalis* e *E. faecium* no tempo de 30 minutos (Figura 6). Houve diferença estatisticamente significante entre os grupos de tratamento (16%, 32%, 64% e clorexidina) e o grupo controle. Nas cepas *E. faecalis* 2,3,7.3, ATCC e na cepa *E. faecium* ATCC não houve diferença estatística significativa entre as concentrações de 16%, 32% e 64% e a clorexidina. A concentração de 16% foi estatisticamente semelhante ao grupo controle para a cepa 4.2 de *E. faecalis*. Para a cepa 4.1 as concentrações de 32% e 64% apresentaram-se estatisticamente semelhante ao grupo controle. A maior redução de biofilme bacteriano foi observada na cepa padrão e cepa 2 de *E. faecalis* (Figura 7 e 8)

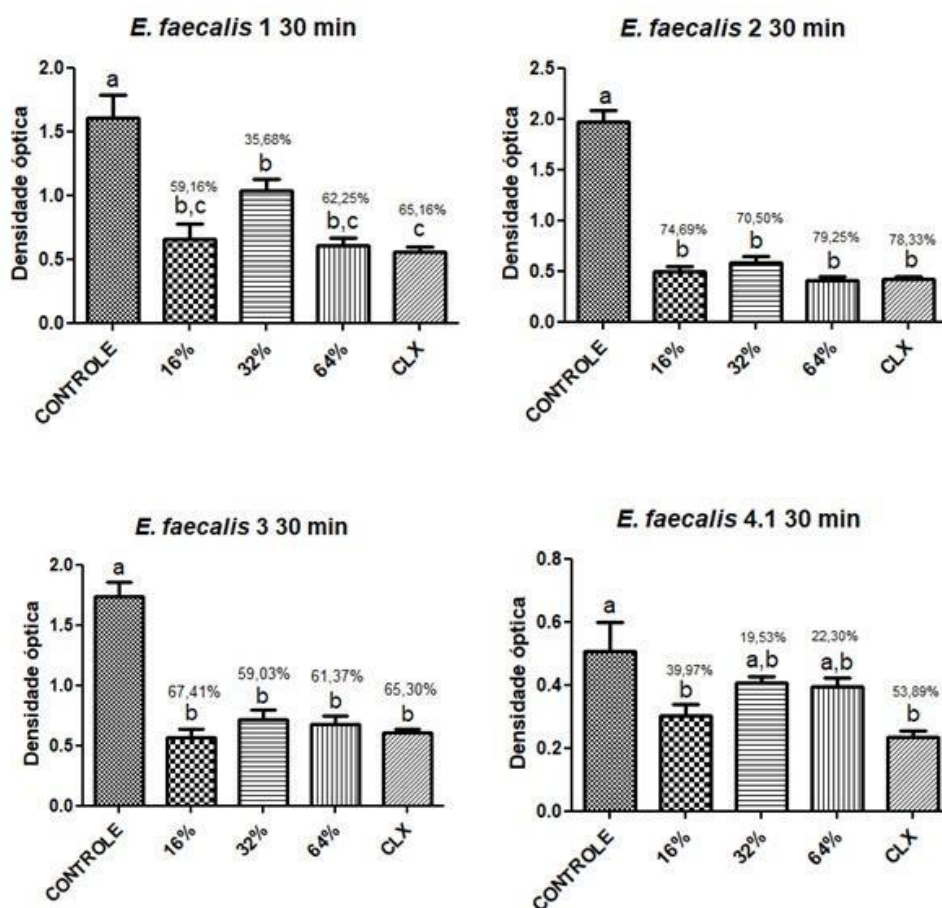
Figura 6 - Representação de placa de 96 poços após o tratamento (16,32,64% e clorexidina) com aplicação do teste de MTT no período de 30 min



Legenda: – (16%) - OE de *L. dentata* à 16%; (32%) – OE de *L. dentata* à 32%; (64%) - OE de *L. dentata* à 64%; (CLX) – clorexidina à 2%; (C-) – Controle negativo em cepas clínica de *E. faecalis* e *E. faecium* no tempo de 30 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora.

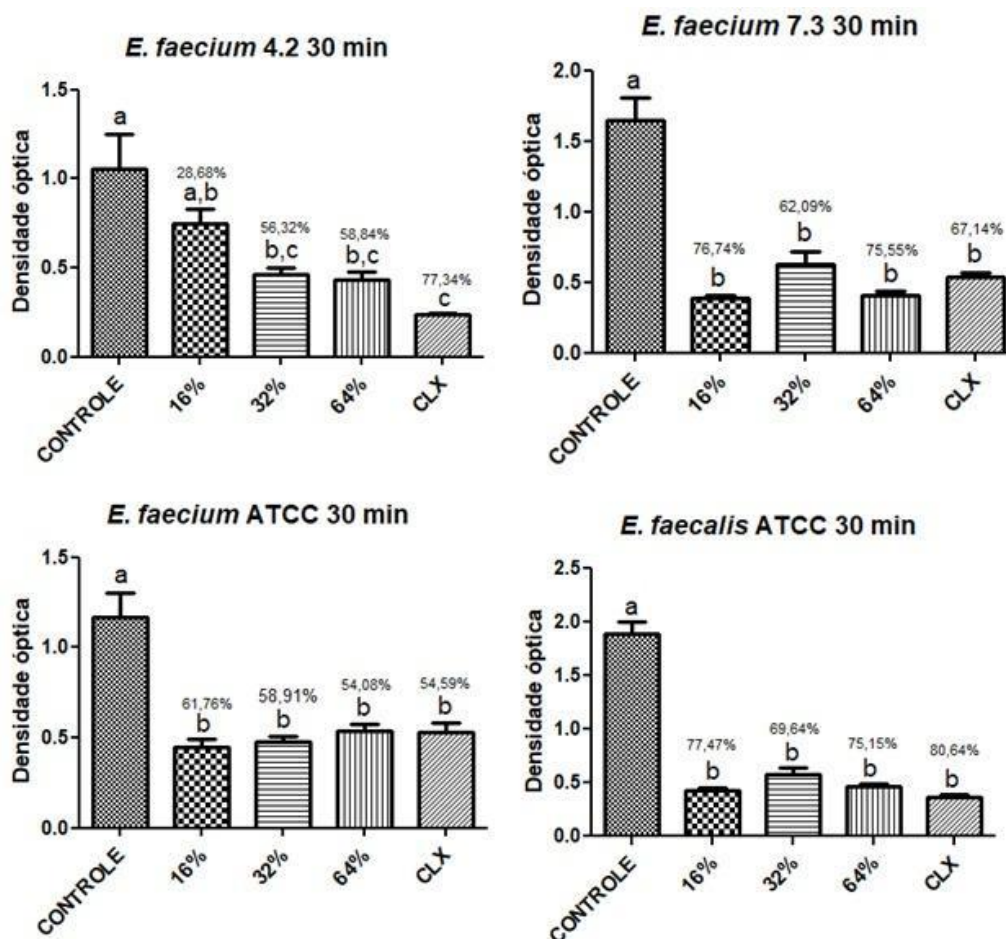
Figura 7 - Valores médios (\pm desvio padrão) de DO e percentual de redução de biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* expostos ao óleo essencial de *L. dentata*



Legenda: (CLX) – Clorexidina 2%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. – UFC /mL de *E. faecalis* e *E. faecium* exposto ao óleo essencial por 30 min (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, P \leq 0,05.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 8 - Valores médios (\pm desvio padrão) de DO e percentual de redução de biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* expostos ao óleo essencial de *L. dentata*



Legenda: (CLX) - Clorexidina 2%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. – UFC /mL de *E. faecalis* e *E. faecium* exposto ao óleo essencial por 30 min (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

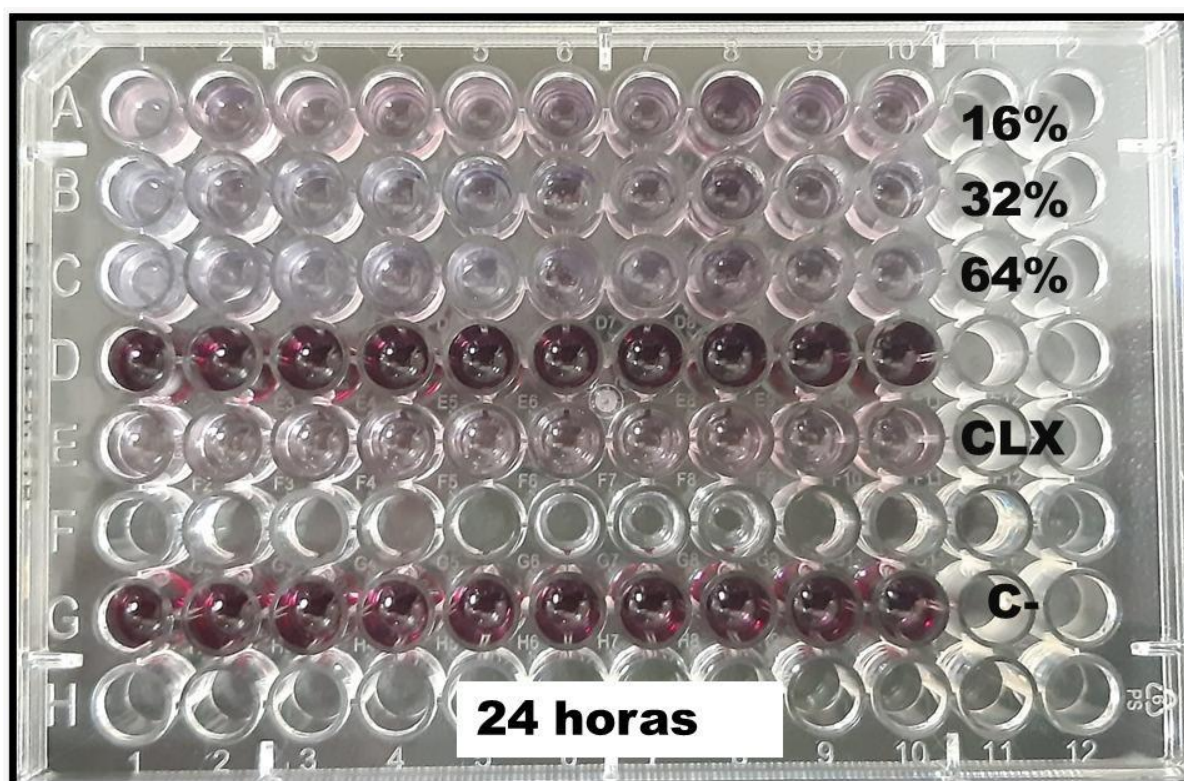
Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as concentrações (16%, 32%, 64%) de óleo essencial de *L. dentata* reduziu significativamente o biofilme de *E. faecalis* e *E. faecium* exposto por 24 horas (Figura 9). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento (16%, 32%, 64% e clorexidina) e o grupo controle. Para o biofilme de *E. faecalis* 1 e *E. faecium* 4.2 não houve diferença estatística entre os tratamentos de óleo essencial de *L. dentata* e a clorexidina. Para o biofilme de *E. faecalis* 2 as concentrações de 16%, 32% e 64% houve redução de 31,75%, 26,08% e 11,01% respectivamente, quando comparada com clorexidina que teve redução de 78,35%,

sendo a menor redução quando comparada com a clorexidina.

Paras cepas de *E. faecium* 7.3, *E. faecium* ATCC e *E. faecalis* ATCC as concentrações de 16%, 32% e a clorexidina apresentavam diferença significativa das comparada com a concentração de 64%, essa apresentou menor potencial de redução de carga bacteriana. No entanto para a cepa 7.3 a concentração de 16% não houve diferença estatisticamente significativa com relação a clorexidina (Figura 10 e 11).

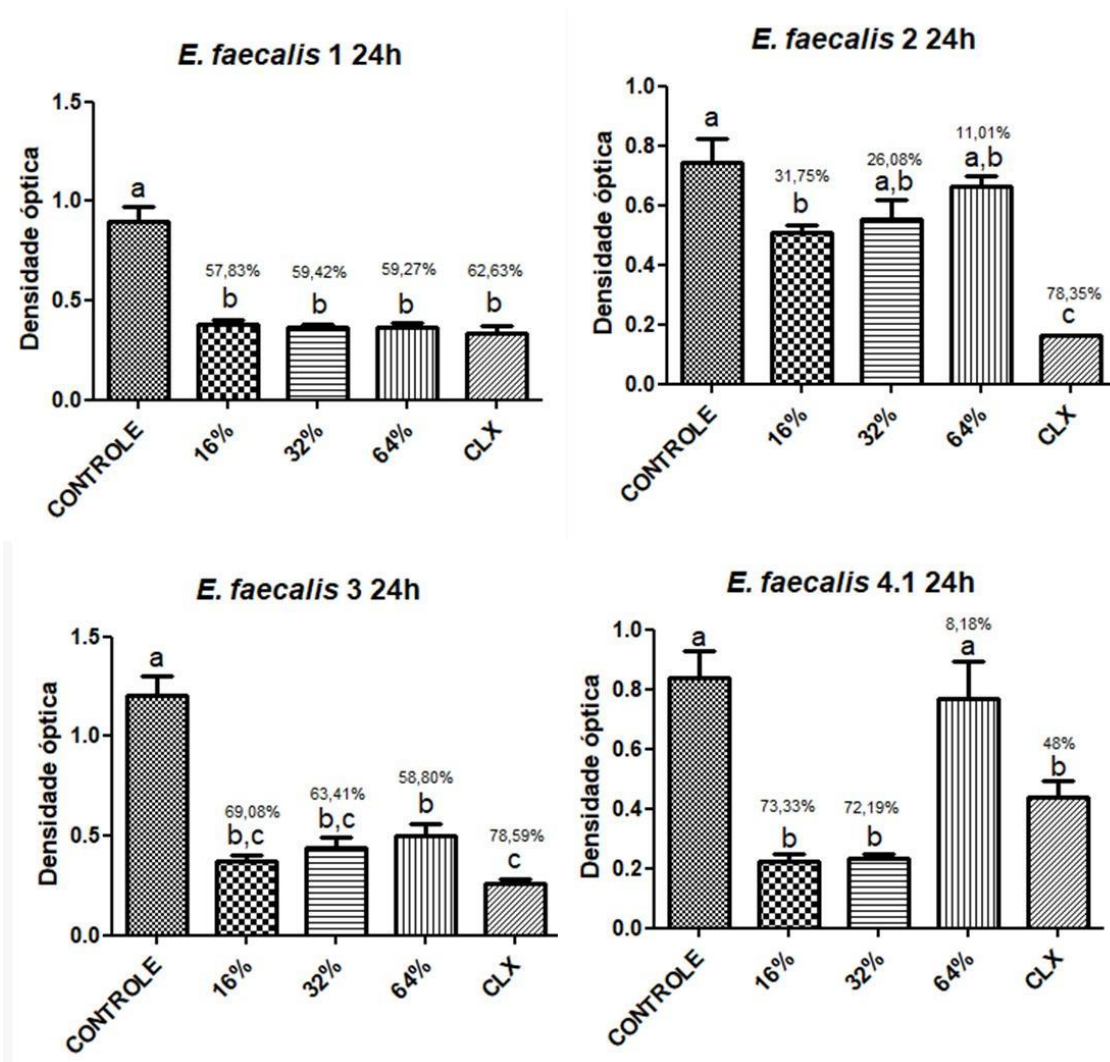
Figura 9 -Representação de placa de 96 poços após o tratamento (16%, 32%, 64% e clorexidina) com aplicação do teste de MTT no período de 24 h



Legenda: – (16%) - OE de *L. dentata* à 16%; (32%) – OE de *L. dentata* à 32%; (64%) - OE de *L. dentata* à 64%; (CLX) – Clorexidina à 2%; (C-) – Controle negativo em cepas clínica de *E. faecalis* e *E. faecium* no tempo de 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

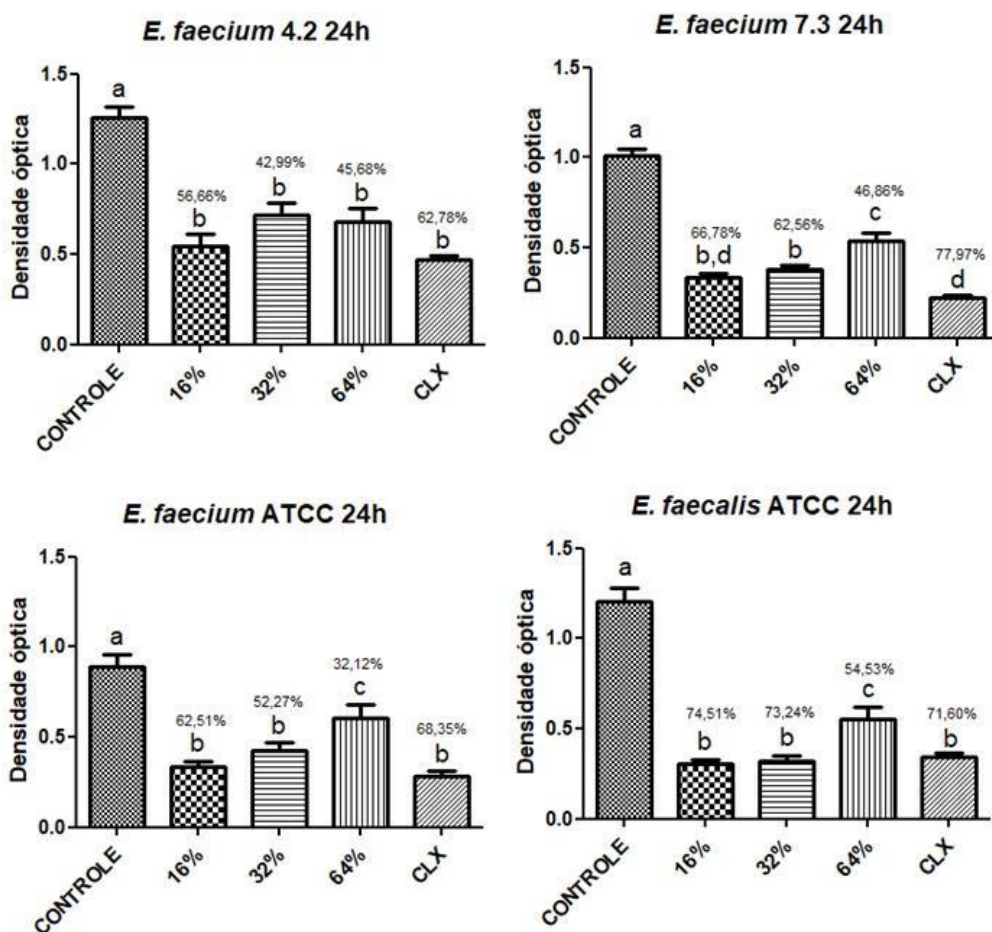
Figura 10 - Valores médios (\pm desvio padrão) de DO e percentual de redução de biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* expostos ao óleo essencial de *L. dentata*



Legenda: (CLX) - Clorexidina 2%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. – UFC /mL de *E. faecalis* e *E. faecium* exposto ao óleo essencial por 24 h (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, P \leq 0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Valores médios (\pm desvio padrão) de DO e percentual de redução de biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* expostos ao óleo essencial de *L. dentata*



Legenda: (CLX) - Clorexidina 2%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. – UFC /mL de *E. faecalis* e *E. faecium* exposto ao óleo essencial por 24 h (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Os microrganismos das infecções intracanal são muito virulentos pois são capazes de colonizar o sistema de canais radiculares, paredes de dentina e formando biofilme bacteriano. Este biofilme é o mecanismo adaptativo mais importante para a sobrevivência do microrganismo em meio às mudanças ambientais decorrentes do tratamento endodôntico (de Paz, 2007).

A razão de selecionar *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foi baseada na literatura que associou o gênero *Enterococcus* spp à persistência da lesão perirradicular após tratamento endodôntico. O estudo de Gomes et al. (2021) observou que a bactéria *E. faecalis* apresentou maior prevalência em canais com infecção persistente, para a detecção foi utilizado a técnica de crescimento de cultura e a técnica de PCR. Já no estudo de Murad et al. (2014) encontrou maior prevalência de *E. faecium* e *S. epidermidis* em lesões endodônticas persistentes, no entanto utilizou-se da técnica de hibridização do DNA. Em uma revisão de literatura atual observamos pouca ou quase nenhum trabalho com associação de *E. faecium* e a endodontia, acreditamos que isto se dê devido a poucos estudos que realizaram testes de hibridização de DNA diferenciando as espécies de *Enterococcus*.

A bactéria *Enterococcus* spp. se adapta ao meio ambiente por diferentes mecanismos, entre eles, formação de biofilme, modificação fisiológica, resposta ao estresse, troca de material genético entre as bactérias (de Paz, 2007) sobrevivendo ao tratamento endodôntico. Devido a essa resistência bacteriana tem-se a necessidade de encontrar novos compostos eficazes contra bactérias responsáveis pelas lesões persistentes, ou seja, quando há falha no tratamento endodôntico. Por essa razão o presente estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial de ação antimicrobiano do óleo essencial (OE) de *L. dentata* sobre os patógenos formadores de biofilme no sistema de canais radiculares *E. faecalis* e *E. faecium*.

Os perfis encontrados OEs de *L. dentata* descritos na literatura apresentam variabilidade ligada à presença de compostos principais, explicados provavelmente devido aos diferentes aspectos biológicos, aspectos ambientais e a época da colheita (Masetto et al., 2011). O estudo de Martins et al. (2019) mostrou que mesmo a *L. dentata* colhida em diferentes regiões do Brasil apresentou compostos similares, bem

como análogos aos encontrados na literatura, garantindo maior fidelidade ao OE de *L. dentata* que utilizamos neste estudo.

De acordo com a literatura a composição predominante do OE de *L. dentata* é o monoterpeno oxigenado, conhecido também como eucaliptol (Giuliani et al., 2020; Hu et al., 2017; Müller-Sepúlveda et al., 2020). No estudo de Giuliani et al. (2020) os monoterpenos oxigenados apresentavam 90,38% seguido de 7,38% de hidrocarbonetos monoterpenos no OE de *L. dentata*. Corroborando com o estudo anterior Müller-Sepúlveda et al. (2020) encontraram dentre os compostos derivados do óleo essencial de *L. dentata*, o 1,8-cineol (eucaliptol) e o β -pineno em maior quantidade. O OE *L. dentata* testado nesse estudo também apresentou concentrações semelhante como 62,02% de 1,8-cinelol seguindo de 17,71% o β -pineno como informa o fabricante.

O eucaliptol ou 1,8-cineol é um monoterpeno oxigenado que apresenta atividade antimicrobiana (Vijayakumar et al., 2020). Em nosso estudo foi observado inibição bacteriana, desta forma fizemos a associação de que a alta concentração do composto (62,02%) resultaria em efeito antimicrobiano contra as cepas clínicas e padrão de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Em nosso teste de CBM verificou-se inibição de crescimento bacteriano de *E. faecalis* e *E. faecium* em ágar BHI com 32% da concentração de OE de *L. dentata*. Em concentrações menores o crescimento bacteriano foi observado em todas as cepas testadas. Não foi possível realizar o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) uma vez que o óleo de *L. dentata* ao se homogeneizar com o *Tween* 20 e em seguida com o meio de cultura *Muller Hilton* apresenta turbidez, não sendo possível verificar a inibição de forma óptica.

Um estudo com características semelhantes ao nosso, utilizou OE de *Myrtus communis* e *E. faecalis* (PTCC 1237) concluiu que na concentração de 0.032-32 $\mu\text{g/mL}$ (0,0032% v/v), o óleo inibiu o crescimento contra o microrganismo testado. Além disso, verificaram que o composto de maior prevalência do OE é o 1, 8-cineole (28.62%), α -pinene (17.8%), linalool (17.55%) (Nabavizadeh et al., 2014). Corroborando com nosso estudo que também apresentou maior concentração de monoterpenos oxigenados com atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. A menor concentração de OE de *M. communis* com atividade antibacteriana contra a cepa estudada pode ser explicada porque o estudo utilizou de cepa padrão, não foi

constatado se houve testes prévios de sensibilidade a outros compostos. O que diferencia do nosso estudo onde as cepas utilizadas nesse estudo foram testadas contra antibióticos e selecionadas as que apresentavam maior resistência a esses compostos.

Nosso estudo demonstrou que nas concentrações de 16%, 32% e 64% do OE de *L. dentata* houve redução da carga bacteriana no biofilme monotípico de *E. faecalis* e *E. faecium* quando comparados com o grupo controle. De acordo com Vijayakumar et al. (2020), a ação antimicrobiana do eucaliptol ocorre impedindo a aderência celular que por sua vez interfere na formação inicial do biofilme. Justificando a redução da carga bacteriana quando em contato com o OE de *L. dentata* sendo importante para um tratamento endodôntico de sucesso, que de acordo com Siqueira e Rôças (2008), o tratamento endodôntico ideal é aquele que reduz a quantidade de carga bacteriana a níveis subcríticos que são compatíveis com a cura da lesão persistente. Testes adicionais deverão ser realizados para quantificar os níveis subcríticos que seriam compatíveis com a cura da lesão.

Além do seu efeito antibacteriano, o eucaliptol ou 1,8- cinelol apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante. De acordo com Juergens (2014) esse componente inibe a produção de radicais de oxigênio, de citocinas e de mediadores inflamatórios envolvidos em doenças das vias aéreas. Esse achado contribui para o OE de *L. dentata* poderia ser parte de uma formulação de irrigante ou medicação intracanal do sistema de canais radiculares, uma vez que teria potencial para reduzir a dor sendo um bom agente anti-inflamatório aos tecidos periapicais, diminuindo os sintomas pós-tratamento endodôntico.

Um estudo realizado por De Faria-Júnior et al. (2012) quantificou em microscópio eletrônico de varredura (MEV) resíduos de hidróxido de cálcio da medicação intracanal com diferentes veículos (propilenoglicol, óleo de silicone e clorexidina 2%) e concluíram que não houve diferença estatística entre os grupos. Propuseram que o fator mais importante durante a remoção da medicação intracanal foi a ação mecânica, ou seja, utilizar instrumentos rotativos ou pontas ultrassônicas para melhor limpeza do sistema de canais radiculares, e não está vinculado ao veículo utilizado, sendo ele propilenoglicol, óleo de silicone ou clorexidina 2%. Desta forma o OE de *L. dentata* poderia, até mesmo, ser utilizado como veículo do hidróxido de cálcio em uma concentração mais baixa como a de 16% que não teve diferença estatística

entre a clorexidina 2%, mas apresenta vantagens em relação a essa medicação como a associação com hipoclorito de sódio sem causar obliteração dos túbulos, e apresenta efeito anti-inflamatório já visto na literatura.

Este é o primeiro estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lavandula dentata* contra cepas clínicas e padrão de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de infecções persistentes de canais radiculares. Os resultados são promissores, uma vez que os microrganismos não são capazes de desenvolver resistência aos óleos essenciais devido à sua complexa natureza. Os compostos de OEs podem atingir diferentes alvos das células bacterianas, como, alteração na membrana celular, síntese de proteínas, produção de ATP, alteração do pH, alteração do DNA, alteração na comunicação de célula-célula (detecção de sérum) a fim de danificá-las (Faleiro, 2011; Łysakowska et al., 2015).

O presente estudo mostrou que o óleo essencial de *L. dentata* apresentou ação antibacteriana contra microrganismos resistentes a antibióticos no período de 30 minutos e 24 horas. A concentração de 16% de OE de *L. dentata* seria a mais recomendada podendo ser indicada sua utilização como substância química auxiliar, devido à grande renovação do agente irrigante no tratamento endodôntico os componentes voláteis teriam maior superfície de contato com o biofilme bacteriano. Outra opção para o uso do OE de *L. dentata* seria como veículo para a medicamento intracanal, observando redução eficiente da carga bacteriana no período de 24 horas. Por se tratar de um estudo *in vitro*, outros estudos *in vivo* são necessários para corroborar com este estudo antes que possa ser usado para fins clínicos.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto o óleo essencial de *Lavandula dentata* apresentou:

- a) Atividade antibacteriana contra cepas clínicas de *E. faecalis* e *E. faecium* com concentração bactericida mínima de 32%
- b) Atividade antibiofilme contra cepas clínicas de *E. faecalis* e *E. faecium* em um tempo de ação de 30 minutos e 24 horas, com resultado semelhante a clorexidina na maioria das cepas testadas.

REFERÊNCIAS

- Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(8):601–11. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.05.007.
- Almohawes ZN, Alruhaimi HS. Effect of *lavandula dentata* extract on ovalbumin-induced asthma in male Guinea pigs. *Brazilian J Biol.* 2020;80(1):87–96. doi: 10.1590/1519-6984.191485. PMID: 31017237.
- 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.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of enterococcus faecalis isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod.* 2016;42(7):1022–8. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.015. PMID: 27221594.
- Barbosa P, Lima AS, Vieira P, Dias LS, Tinoco MT, Barroso JG, et al. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nematol.* 2010;42(1):8–16. doi: 10.1094/PDIS-12-10-0902. PMID: 22736831.
- Bertolini PFR, Biondi Filho O, Pomilio A, Pinheiro SL, de Carvalho MS. Antimicrobial capacity of Aloe vera and propolis dentifrice against *Streptococcus mutans* strains in toothbrushes: An in vitro study. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(1):32–7. doi: 10.1590/S1678-77572012000100007.
- Bouazama S, Harhar H, Costa J, Desjobert, J M, Talbaoui A, Tabyaoui M. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lavandula pedunculata* and *Lavandula dentata*. *J Mater Environ Sci.* 2017;8(6):2154–60.
- Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FG da R, Alves MC, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod.* 2017;43(8):1237–45. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. PMID: 28606669.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phyther Res.* 2002;16(4):301–8. doi: 10.1002/ptr.1103. PMID: 12112282.
- Co S, Vivot W, Szusz W, Albo G. Antifungal Activity of Essential Oils Against *Candida* Species Isolated from Clinical Samples. *Mycopathologia.* 2019 Oct; 184 (5):615–23. doi: 10.1007/s11046-019-00364-5.
- Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3903–10. doi: 10.2147/IDR.S234610.
- Dias-da-Silva MA, Pereira AC, Marin MCC, Salgado MAC. The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. *J Clin Exp Dent.* 2013;5(4):169–73. doi: 10.4317/jced.51104.

Faleiro ML. The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas A, editor. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Vol. 2. Badajoz, Spain: Edition Microbiology book series-2011, Formatex Research Center. 2011, p. 1143-56.

De Faria-Júnior NB, Keine KC, Só MVR, Weckwerth PH, Guerreiro-Tanomaru JM, Kuga MC. Residues of calcium hydroxide-based intracanal medication associated with different vehicles: A scanning electron microscopy evaluation. *Microsc Res Tech*. 2012;75(7):898–902. doi: 10.1002/jemt.22010. PMID: 22279037.

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

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009;155(6):1749–57. doi: 10.1099/mic.0.026385-0. PMID: 19383684.

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

Gao Y, Jiang X, Lin D, Chen Y, Tong Z. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. *J Endod*. 2016;42(8):1233–8. doi: 10.1016/j.joen.2016.05.002. PMID: 27316318.

Ghorbanzadeh R, Assadian H, Chiniforush N, Parker S, Pourakbari B, Ehsani B, et al. Modulation of virulence in *Enterococcus faecalis* cells surviving antimicrobial photodynamic inactivation with reduced graphene oxide-curcumin: An ex vivo biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;29:101643. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101643. PMID: 31899382.

Giuliani C, Bottoni M, Ascrizzi R, Milani F, Papini A, Flamini G, et al. *Lavandula dentata* from Italy: Analysis of Trichomes and Volatiles. *Chem Biodivers*. 2020;17(11): e2000532. doi: 10.1002/cbdv.202000532. PMID: 32965746.

Gomes BPFA, Francisco PA, Godoi EP, Endo MS, Barbosa-Ribeiro M, Delboni MG, 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):1075–86. doi: 10.1016/j.joen.2021.04.011. PMID: 33887307.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2008;34(5):537–40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016. PMID: 18436030.

Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Araguê Catanoze I, dos Santos DM, et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Arch Oral Biol*. 2020;109: 104577. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104577. PMID: 31606567.

Hickl J, Argyropoulou A, Sakavitsi ME, Halabalaki M, Al-Ahmad A, Hellwig E, et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. 2018;13(12):1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0207574.

Hu Z, Wang C, Shen H, Zhang K, Leng P. Antioxidant effect of aromatic volatiles emitted by *Lavandula dentata*, *Mentha spicata*, and *M. piperita* on mouse subjected to low oxygen condition. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017;81(12):2386–95. doi: 10.1080/09168451.2017.1385382. PMID: 29027503.

Insawang S, Pripdeevech P, Tanapichatsakul C, Khruengsai S, Monggoot S, Nakham T, Artrod A, D'Souza PE, Panuwet P. Essential Oil Compositions and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five *Lavandula stoechas* Cultivars Grown in Thailand. *Chem Biodivers*. 2019 Oct;16(10):e1900371. doi: 10.1002/cbdv.201900371. Epub 2019 Sep 19. PMID: 31464066.

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

Juergens UR. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole : current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Res (Stuttg)*. 2014 Dec; 64(12):638–46. doi: 10.1055/s-0034-1372609.

Justus B, de Almeida VP, Gonçalves MM, da Silva Fardin de Assunção DP, Borsato DM, Arana AFM, et al. Chemical composition and biological activities of the essential oil and anatomical markers of *lavandula dentata* l. Cultivated in Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. 2018;61: e18180111. doi: 10.1590/1678-4324-2018180111.

Kamath NP, Tandon S, Nayak R, Naidu S, Anand PS, Kamath YS. The effect of aloe vera and tea tree oil mouthwashes on the oral health of school children. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2020;21(1):61–6. doi: 10.1007/s40368-019-00445-5. PMID: 31111439.

Karpiński TM, Ożarowski M, Seremak-Mrozikiewicz A, Wolski H, Adamczak A. Plant preparations and compounds with activities against biofilms formed by *candida* spp. *J Fungi (Basel)*. 2021 May 5;7(5):360. doi: 10.3390/jof7050360. PMID: 34063007; PMCID: PMC8147947.

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

Kim MA, Rosa V, Min KS. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. *Sci Rep*. 2020;10(1):21867. doi: 10.1038/s41598-020-78998-5. PMID: 33318537.

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

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

Liu Y, Ping Y, Xiong Y, Zhou R, Xu F, Wang J, et al. Genotype, biofilm formation ability and specific gene transcripts characteristics of endodontic *Enterococcus faecalis* under glucose deprivation condition. *Arch Oral Biol*. 2020 Oct;118:10487.. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104877. PMID: 32828986.

Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J, McPhee DJ. The sensitivity of endodontic

enterococcus Spp. Strains to geranium essential oil. *Molecules*. 2015;20(12):22881–9. doi: 10.3390/molecules201219888. PMID: 26703546.

Ma L, Chen J, Han H, Liu P, Wang H, Lin S, Zhang Q, Lu D, Zhang X. Effects of lemon essential oil and limonene on the progress of early caries: An in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2020 Mar;111:104638. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104638. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31901573.

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

Martins R de P, Gomes RA da S, Malpass ACG, Okura MH. Chemical characterization of *lavandula dentata* L. Essential oils grown in uberaba-mg. *Cienc Rural*. 2019;49(8): e20480964. doi: 10.1590/0103-8478cr20180964.

Masetto MAM, Deschamps C, Mógor AF, Bizzo HR. Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L. em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(4):413–21. doi: 10.1590/s1516-05722011000400007.

Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutrients*. 2016 Nov 17;8(11):731. doi: 10.3390/nu8110731. PMID: 27869665; PMCID: PMC5133115

Moumni M, Allagui MB, Mezrioui K, Ben Amara H, Romanazzi G. Evaluation of seven essential oils as seed treatments against seedborne fungal pathogens of *cucurbita maxima*. *Molecules*. 2021 Apr 18;26(8):2354. doi: 10.3390/molecules26082354. PMID: 33919567.

Müller-Sepúlveda A, Chevecich CC, Jara JA, Belmar C, Sandoval P, Meyer RS, et al. Chemical Characterization of *Lavandula dentata* Essential Oil Cultivated in Chile and Its Antibiofilm Effect against *Candida albicans*. *Planta Med*. 2020;86(16):1225–34. doi: 10.1055/a-1201-3375. PMID: 32663893.

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

Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Gonçalves A, Pina-Vaz I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *Biomed Res Int*. 2014;2014:592423. doi: 10.1155/2014/592423. Epub 2014 May 28. PMID: 24982899; PMCID: PMC4058271.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004;37(1):38–41. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00749.x. PMID: 14718055.

de Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci*. 2019 Jan 9;26(1):5. doi: 10.1186/s12929-019-0499-8. PMID: 30621719; PMCID: PMC6325740.

de Oliveira M, Helena M, Almeida T, Antonio L. *Revista Odonto Ciência-Fac. Odonto/PUCRS*, v. 21, n. vol. 53.

Paulsen IT, Banerjee L, Hyers GSA, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* (80-). 2003;299(5615):2071–4. doi: 10.1126/science.1080613. PMID: 12663927.

Perrucci S, Macchioni G, Cioni PC, Flamini G, Morelli I, Taccini F. The activity of volatile compounds from *Lavandula angustifolia* against *Psoroptes cuniculi*. *Phyther Res*. 1996;10(1):5–8. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199602)10:1<5::AID-PTR758>3.0.CO;2-W.

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

Raheem IAA, Razek AA, Elgendy AA, Saleh NM, Shaaban MI, El-Hady FKA. Design, evaluation and antimicrobial activity of egyptian propolis-loaded nanoparticles: Intrinsic role as a novel and naturally based root canal nanosealer. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:8379–98. doi: 10.2147/IJN.S219577.

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

Rôças IN, Siqueira JF. Identification of Bacteria Enduring Endodontic Treatment Procedures by a Combined Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Reverse-Capture Checkerboard Approach. *J Endod*. 2010;36(1):45–52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022. PMID: 20003934.

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

Sarda RA, Shetty RM, Tamrakar A, Shetty SY. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, diode laser, and sodium hypochlorite and their combinations on endodontic pathogens. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;28:265–72. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.09.009. PMID: 31585175.

Shabbir J, Qazi F, Farooqui W, Ahmed S, Zehra T, Khurshid Z. Effect of Chinese propolis as an intracanal medicament on post-operative endodontic pain: A double-blind randomized controlled trial. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 9;17(2):445. doi: 10.3390/ijerph17020445. PMID: 31936519.

Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028. PMID: 18928835.

Siqueira JF, De Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996;22(12):674–6. doi: 10.1016/S0099-2399(96)80062-8. PMID: 9220753.

Stępień-Pyśniak D, Hauschild T, Kosikowska U, Dec M, Urban-Chmiel R. Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. *Sci Rep*. 2019 Aug 1;9(1):11204. doi: 10.1038/s41598-019-47602-w. PMID: 31371744.

Taylor HD, Austin JH. The solvent action of antiseptics on necrotic tissue. *J Exp Med*. 1918 Jan 1;27(1):155-64. doi: 10.1084/jem.27.1.155. PMID: 19868192; PMCID: PMC2125954.

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

Tofiño-Rivera A, Ortega-Cuadros M, Galvis-Pareja D, Jiménez-Rios H, Merini LJ, Martínez-Pabón MC. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *J Ethnopharmacol.* 2016 Dec 24; 194:749–754. doi: 10.1016/j.jep.2016.10.044. PMID: 27765606.

Uday Mohan PVM, Uloopi KS, Vinay C, Rao RC. In vivo comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in primary teeth. *Contemp Clin Dent.* 2016;7(1):45–50. doi: 10.4103/0976-237X.177110.

Valera MC, Silva KCG, Maekawa LE, Carvalho CAT, Koga-ito CY, Camargo CH, Lima RS. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in. *J Appl Oral Sci.* 2009 Nov-Dec;17(6):555–9. Doi: 10.1590/S1678-77572009000600003. PMID:20027425; PMCID: PMC4327512

Vijayakumar K, Manigandan V, Jeyapragash D, Bharathidasan V, Anandharaj B, Sathya M. Eucalyptol inhibits biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* and its mediated virulence factors. *J Med Microbiol.* 2020;69(11):1308–18. doi: 10.1099/jmm.0.001253. PMID: 32930658.

Xu J, He J, Shen Y, Zhou X, Huang D, Gao Y, et al. Influence of Endodontic Procedure on the Adherence of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2019;45(7):943–9. doi: 10.1016/j.joen.2019.04.006.

Yu Z, Tang J, Khare T, Kumar V. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? *Fitoterapia.* 2020 Jan;140:104433. doi: 10.1016/j.fitote.2019.104433. PMID: 31760066.

Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(6):1163–8. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.06.035. PMID: 22613548.

APÊNDICE A - Estudo piloto

Para a escolha do fitoterápico realizamos o teste com seis diferentes óleos essenciais, Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Erva doce (*Foeniculum vulgare*), Lemongrass (*Cymbopogon schoenanthus*), Gerânio (*Pelargonium graveolens*) e Lavanda Francesa (*Lavandula officinalis*) e extratos glicólicos, Nogueira (*Juglans regia*), Quilaia (*Quillaja saponaria*), Aroeira (*Schinus terebinthifolia*), Confrei (*Symphytum officinale*), *Capsicum*, Alcachofra (*Cynara cardunculus*), Barbatimão (*Stryphnodendron*), Arruda (*Ruta graveoleons*), Gengibre (*Zingiber officinale*), Ginseng (*Panax ginseng*), Acabateiro (*Persea americana*), Guaçatonga (*Casearia sylvestris*) para determinar a *Concentração Bactericida Mínima (CBM)*, contra oito cepas de *Enterococcus spp.* (5 *E. faecalis* e 3 *E. faecium*) como resultado obtivemos que não houve inibição de crescimento em nenhum dos tratamentos.

ANEXO A – Certificado de análise

18/11/2021 08:59

Imprime

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

NOME DO PRODUTO: OLEO ESSENCIAL LAVANDA BRASIL 10ML

INCI NAME: *Lavandula officinalis ssp dentata*

CAS: 84776-65-8

LOTE: 01705/21

FABRICAÇÃO: 04/2021

VALIDADE: 04/2024

ITENS CONTROLADOS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Cor:	Amarelo Palha	Amarelo Palha
Odor:	Característico	Característico
Aspecto:	Líquido Límpido	Líquido límpido
Impurezas:	Isento	Isento
Densidade(20°):	0,885 - 0,915 g/cm3	0,915
Índice de Refração(20°):	1,450 - 1,480	1,468

Resultado: Aprovado

Condições de Armazenagem: Armazenar em local fresco e arejado ao abrigo da luz, à temperatura constante, preferencialmente ambiente.

O certificado não dispensa o usuário de responsabilidade de realizar seus próprios testes para avaliar as características do produto e sua adequação à aplicação pretendida.

Data de Análise: 18/11/2021


Mayra Rampinelli
Gerente de Qualidade
CRF SP 52.315

Este certificado foi processado automaticamente portanto dispensa assinatura.

wnf.com.br

Indústria

Rua Dr. Marlo Pinto Serva, 65
Casa Verde - São Paulo - SP
(55 11) 3857 7790

	Perfil analítico	Revisão: 00
		Página 1 de 2

Identificação do Produto	
Nome	Óleo essencial Lavanda Brasil
Inci name	Lavandula Dentata Flower/Leaf Oil
Cas	93165-50-5
Código Interno	PW0126
Nome Botânico	Lavandula dentata
Certificação botânica	Herbário da UMC, voucher 7236
Nome Popular	Lavanda, Alfazema, lavanda brasileira
Família Botânica	Lamiaceae
Origem	Monte Verde, MG, Brasil
Órgão da planta	Partes aéreas da Lavanda
Método de extração	Destilação por arraste a vapor
Quimiotipo (QT)	Não se aplica
Principais componentes	1,8-cineol, B-pineno, Linalol
Normas reguladoras	Não se aplica.

Análises Físico-químicas				
Lote: 111320				
Análises	Metodologia	Resultado	Especificação	Avaliação
Cor	MACQ001	Amarelo palha	Amarelo palha	Aprovado
Odor	MACQ002	Característico	Característico	Aprovado
Aspecto	MACQ003	Líquido límpido	Líquido límpido	Aprovado
Impurezas	MACQ004	Isento	Isento	Aprovado
Densidade	MACQ005	0,915	0,885 – 0,915g/cm ³	Aprovado
Índice de Refração	MACQ010	1,468	1,450– 1,480	Aprovado

WNF - World's Natural Fragrances
 Rua Dr. Mario Pinto Serva, 65 • Casa Verde • São Paulo - SP • +55 11 3857-7790 • CNPJ
 03.867.312/0001-95

www.wnf.com.br •    @wnfoficial


Aromagia

 vegana

 WNF

IMUNO

 Etiqa

	Perfil analítico	Revisão: 00
		Página 2 de 2

Cromatografia (CG/MS)	
Condições analíticas	Temperatura do injetor 250°C, Modo e injeção <i>Split</i> , Fluxo 1 mL min ⁻¹ , Gás de arraste: Hélio, Coluna capilar: DB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm), Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min., Temperatura do detector de massas: 260°C, Temperatura da Fonte de ionização: 280°C e Modo de aquisição: <i>scan</i>
Equipamento	<i>Shimadzu</i> , Modelo GCMS-QP2010 plus
Compostos presentes no óleo essencial e distribuição dos grupos funcionais	