



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Patrícia Conde Vital

**Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações
intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Patrícia Conde Vital

**Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações
intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, na Área de Endodontia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2018

Vital, Patrícia Conde

Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas
medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos
essenciais / Patrícia Conde Vital. – Araraquara: [s.n.], 2018

55 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Análise microbiológica 2. Hidróxido de cálcio 3. Óleos voláteis
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Patrícia Conde Vital

**Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações
intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof^a. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof^o. Dr^o. Guilherme Ferreira da Silva

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara, 28 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Patrícia Conde Vital

NASCIMENTO: 24.05.1992 – Botucatu/SP

FILIAÇÃO: Paulo Sérgio Vital e Laura Inês Conde Vital

2010 – 2015 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP/USP)

2016 – 2018 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP)

2017 – atual Curso de Especialização em Endodontia pela Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, SP.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)*, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-reitor Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa da sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e Vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves Campos.

Ao *Departamento de Odontologia Restauradora* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Juliane M. Guerreiro Tanomaru e Vice-chefe Prof. Dr. Milton Carlos Kuga.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia*, coordenado pelo Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli.

À minha orientadora do Mestrado *Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru*, pela orientação, apoio, confiança e pelo empenho dedicado na elaboração desse projeto.

Aos meus colegas de Pós-graduação e a Pós-doutoranda *Dra. Gisselle Moraima Chávez Andrade* pela colaboração.

A *CAPES* pela concessão das bolsas de estudos.

Vital PC. Avaliação do pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de novas medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a óleos essenciais [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Micro-organismos resistentes dificultam a atuação de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio. Óleos essenciais podem ser usados para aumentar a atividade antimicrobiana. O objetivo do presente estudo foi avaliar o pH e atividade antimicrobiana/antibiofilme de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio (HC) associadas aos óleos essenciais, *Lemongrass* e *Thyme*, em comparação às associações com clorexidina (CLX) e paramonoclorofenol canforado (PMCC). As medicações intracanal (MICs) avaliadas foram: Calen® + *Lemongrass* (HC-LE), Calen® + *Thyme* (HC-TH), Calen® (HC), Calen PMCC® (HC-PMCC) e Calen® + CLX (HC-CLX.) O estudo foi dividido em duas publicações. **Publicação 1-** avaliou o pH e a atividade antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*. O pH foi avaliado nos períodos de 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A efetividade antibacteriana foi avaliada após contaminação por 21 dias dos canais radiculares de dentes humanos extraídos. Foram realizadas 3 coletas para a contagem de UFC mL⁻¹: C1- após contaminação, C2- após 7 dias com MICs e C3- após 7 dias da remoção das MICs. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$). Maior pH ocorreu nos períodos iniciais (12 h - 7 dias). Todas as MICs promoveram pH alcalino sem diferença entre elas ($p<0,05$). Todas as MICs avaliadas demonstraram atividade antibacteriana. No entanto, associações aos óleos essenciais demonstraram menor contagem bacteriana de proximadamente 10,57% em comparação ao controle positivo (sem MIC). **Publicação 2-** avaliou a capacidade de difusão de íons hidroxila e a atividade antibiofilme sobre *E. faecalis*. A difusão de íons hidroxila em dentina bovina foi avaliada após preenchimento de canais radiculares com as MICs e mensuração do pH nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A avaliação da atividade antibiofilme foi realizada por meio do teste de contato direto sobre *E. faecalis* utilizando blocos de dentina radicular bovina. A análise foi realizada pela contagem de UFC mL⁻¹. Os dados foram analisados estatisticamente por meio dos testes ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). HC-PMCC apresentou maior pH no período de 1 dia que as demais MICs ($p<0,05$). A partir de 14 dias, as MICs não apresentaram diferença estatística significativa entre elas ($p>0,05$). Todas as MICs promoveram diminuição da contagem bacteriana sobre biofilme de *E. faecalis* em comparação ao controle positivo, com destaque para as associações com LE e TH que mostraram maior redução ($p<0,0001$). Conclui-se que a adição dos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme* mantem o pH alcalino do HC (Calen®), sendo similar às associações com CLX e PMCC e promove maior efetividade antibacteriana ex vivo contra *E. faecalis*. Os óleos essenciais não impedem a capacidade de difusão de íons hidroxila das MICs à base de HC, mantendo o pH alcalino e são capazes de atuar sobre biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: Análise microbiológica. Hidróxido de cálcio. Óleos voláteis.

Vital PC. Evaluation of pH and antimicrobial/antibiofilm activity of novel intracanal medications based on calcium hydroxide associated with essential oils [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Resistant microorganisms make it difficult the activity of intracanal calcium hydroxide-based medications. Essential oils can be used to increase their antimicrobial effectiveness. The aim of the present study was to evaluate the pH and antimicrobial/antibiofilm activity of intracanal calcium hydroxide (CH) - based medications associated with essential oils, *Lemongrass* and *Thyme*, in comparison to combinations with chlorhexidine (CHX) and camphorated mono-parachlorophenol (CMCP). The intracanal medications (IMs) evaluated were: Calen® + *Lemongrass* (CH-LE), Calen® + *Thyme* (CH-TH), Calen® (CH), Calen CMCP® (CH-CMCP) and Calen® + CHX (CH-CHX). The study was divided into two publications. **Publication 1-** aims to evaluate the pH and antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. The pH was evaluated in the periods of 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. The antibacterial effectiveness was evaluated after contamination for 21 days of the root canals of extracted human teeth. Three samples were performed for counting of CFU mL⁻¹: S1- after contamination, S2- after 7 days with IMs, and S3- after 7 days of removal of IMs. Data were submitted to statistical analysis by ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn ($\alpha=0.05$). Higher pH occurred in the initial periods (12 h - 7 days). All IMs promoted alkaline pH with no difference between them ($p<0.05$). All IMs showed antibacterial activity. However, associations to essential oils showed lower bacterial counts about 10.57% in comparison to positive control (without IM). **Publication 2-** aims to evaluate the diffusion capacity of hydroxyl ions and the antibiofilm activity against *E. faecalis*. The diffusion of hydroxyl ions through the bovine dentin was evaluated after root canal filling with IMs and pH measurement at 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. The evaluation of the antibiofilm activity was performed by direct contact test on *E. faecalis* biofilm formed on bovine root dentin blocks. The analysis was performed by counting of CFU mL⁻¹. Data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$). CH-CMCP showed higher pH in 1 day than the other IMs ($p<0.05$). From 14 days, IMs did not present a significant statistical difference between them ($p>0.05$). All IMs were able to decrease the bacterial count on *E. faecalis* biofilm ($p>0.05$) compared to positive control, with emphasis on LE and TH associations ($p<0.0001$). It is concluded that the addition of *Lemongrass* and *Thyme* essential oils maintains the alkaline pH of CH (Calen®), being similar to CHX and CMCP associations and exhibiting ex vivo antibacterial effectiveness against *E. faecalis*. The essential oils do not interfere with the diffusion capacity of hydroxyl ion from intracanal CH-based medications, maintaining alkaline pH and they have an effect on *E. faecalis* biofilms.

Keywords: Microbiological analysis. Calcium hydroxide. Oils, volatile.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	12
2.1 Proposição Geral	12
2.2 Proposição Específica	12
3 PUBLICAÇÕES	13
3.1 Publicação 1	13
3.2 Publicação 2	25
4 DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A- METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 1	46
APÊNDICE B- METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 2	49
ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP)..	52
ANEXO B- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	55

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos representam o principal agente etiológico da necrose pulpar e da formação da lesão periapical¹. A persistência de micro-organismos no Sistema de Canais Radiculares (SCR) é a principal causa de fracasso do tratamento endodôntico²⁻⁴. A anatomia complexa do SCR dificulta a sua completa limpeza e desinfecção⁵.

A infecção endodôntica abriga uma microbiota polimicrobiana com espécies aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas organizada em biofilme^{3,5-8}. Biofilmes são comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, por exemplo, polissacarídeo e proteínas, na qual as células aderem-se umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces⁹⁻¹¹, apresentando grande resistência a antissépticos e antibióticos¹². A eliminação do biofilme e a destruição das bactérias do SCR são objetivos da desinfecção endodôntica¹³. Mesmo após o preparo biomecânico, os biofilmes podem permanecer no interior dos canais radiculares¹⁴⁻¹⁶.

Enterococcus faecalis é um coco Gram-positivo que apresenta maior resistência aos antimicrobianos, sendo capaz de sobreviver nos túbulos dentinários e reinfetar o canal radicular após obturação^{17,18}. É o micro-organismo de maior prevalência em dentes com insucesso de tratamento¹⁹, onde o retratamento é indicado²⁰⁻²². Diferentes cepas de *E. faecalis* podem interagir sinergicamente ou antagonicamente com um consórcio de bactérias do SCR. Os possíveis mecanismos que explicam essa interação é a produção de diferentes níveis de proteases, bem como possíveis diferenças de fatores de virulência²³.

As medicações intracanal (MICs) atuam de forma complementar ao preparo biomecânico na desinfecção do SCR^{24,25}. Por apresentar excelentes propriedades biológicas e atividade antimicrobiana, o hidróxido de cálcio (HC) é amplamente utilizado²⁶. Além disso, apresenta capacidade de dissolver tecido orgânico²⁷, inibir a reabsorção dentária e induzir a formação de tecido duro²⁸, estimular a proliferação de osteoblastos²⁹ e inativar endotoxinas bacterianas³⁰. A difusão dos íons hidroxila através dos túbulos dentinários e da superfície externa da raiz é responsável pelo efeito antimicrobiano do HC³¹. Estes íons são radicais livres com alto poder de reatividade³² e capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir sua atividade celular³³.

O HC apresenta menor efetividade frente à espécie *E. faecalis*, que é um micro-organismo resistente a diversos agentes antimicrobianos^{34,35}. Desta forma, a sua associação com outros antimicrobianos é proposta para aumentar seu espectro de ação, como paramonoclorofenol canforado (PMCC)³⁶⁻³⁸ e clorexidina (CLX)^{39,40}. A associação ao PMCC

não interfere nas propriedades do HC³⁶, amplia o espectro antimicrobiano^{36,37} e forma um composto chamado de paramonoclorofenolato de cálcio, responsável pela liberação prolongada de íons cálcio e hidroxila⁴¹.

A CLX é uma bisbiguanida catiônica, que apresenta ampla ação antimicrobiana⁴² e substantividade⁴³. Ela tem sido utilizada como solução irrigadora e MIC em endodontia. A CLX apresenta boa atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos⁴⁴. A CLX já foi estudada como MIC isoladamente^{45,46}, ou em associação a outras substâncias⁴⁵⁻⁴⁷, e os estudos demonstram o efeito sinérgico da CLX quando associada ao HC^{45,47}.

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e/ou seus componentes em relação a patógenos humanos e animais têm sido estudadas^{48,49}. O gênero *Thymus vulgaris* abrange inúmeras espécies e variedades, que tiveram seus óleos essenciais estudados, como por exemplo, o tomilho (conhecido como *Thyme* em inglês)^{50,51}. O óleo essencial de *Thyme* (rico em *timol*, apresentando vestígios de *carvacrol*) é cientificamente reconhecido pelas suas ações potentes bactericidas e fungicidas⁵². Tomilho e *carvacrol* demonstram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*⁵³, além de atividade antibiofilme⁵⁴. Estas substâncias apresentam capacidade de danificar a integridade da membrana plasmática, afetando o pH intra-celular e o equilíbrio iônico do citoplasma⁵⁵. O óleo essencial de tomilho demonstra atividade antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas, entre elas *E. faecalis*⁵⁶. Além disso, demonstra ter capacidade significativa de não gerar resistência antimicrobiana à esse micro-organismo⁵⁶.

A espécie *Cymbopogon citratus*, pertencente à família *Poaceae* (gramíneas), é conhecida por mais de 20 nomes, entre estes *Lemongrass*, erva perfumada e erva cidreira⁵⁷. O uso econômico mais expressivo de *C. citratus* é a produção de seu óleo essencial, rico em citral, e amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos⁵⁷. A atividade antibacteriana de óleo de *C. citratus* ocorre principalmente em função da presença de alfa e beta citral⁵⁸. O óleo essencial de *Lemongrass* foi avaliado sobre 5 cepas (2 MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina e 3 MRSA - *S. aureus* resistentes à meticilina) demonstrando a sua capacidade de interromper a formação de biofilme, bem como promover sua desestruturação⁵⁹. As soluções de óleos essenciais de *Lemongrass* e *Thyme* promovem redução do biofilme de *Aeromonas hydrophila* formado em superfícies de aço inoxidável⁶⁰.

A eliminação de micro-organismos resistentes ainda hoje é um grande desafio na terapia endodôntica. Deste modo, é necessária a avaliação de novas substâncias que

possibilitem maior efetividade de medicações à base de HC, como pela sua associação aos óleos essenciais.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Proposição Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o pH e atividade antibacteriana/antibiofilme de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio em associações com óleos essenciais, *Lemongrass* e *Thyme*, em comparação as associações com clorexidina (CLX) e paramonoclorofenol canforado (PMCC).

2.2 Proposição Específica

A proposição específica foi dividida conforme as publicações 1 e 2:

- **Publicação 1**

Avaliar o pH e atividade antibacteriana de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas aos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme*, em comparação as associações com CLX e PMCC.

- **Publicação 2**

Avaliar a capacidade de difusão de íons hidroxila e atividade antibiofilme de medicações intracanal á base de hidróxido de cálcio associadas aos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme*, em comparação as associações com CLX e PMCC.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1

Avaliação do pH e da atividade antibacteriana de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada a óleos essenciais*

Resumo

Introdução: Este estudo avaliou o pH e a atividade antibacteriana de medicações intracanal (MICs) à base de hidróxido de cálcio (HC) associadas aos óleos essenciais de *Thyme* (TH) e *Lemongrass* (LE), além de paramonoclorofenol canforado (PMCC) e clorexidina (CLX). As MICs avaliadas foram: Calen® (HC), Calen®+*Lemongrass* (HC-LE), Calen®+*Thyme* (HC-TH), Calen+PMCC® (HC-PMCC) e Calen®+CLX (HC-CLX). **Métodos:** O pH foi avaliado nos períodos de 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após preenchimento de tubos de polietileno com as MICs. A efetividade antibacteriana foi avaliada após contaminação dos canais radiculares de dentes humanos unirradiculares extraídos com cepa padrão de *Enterococcus faecalis*. Após incubação por 21 dias, foram realizadas 3 coletas para a contagem de UFC mL⁻¹: C1- após contaminação, C2- após 7 dias com MICs e C3- após 7 dias da remoção das MICs. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha = ,05$). **Resultados:** Maiores valores de pH foram encontrados nos períodos iniciais (12 h - 7 dias), sem diferença significativa entre as MICs ($P < ,05$). Todas as associações de MICs avaliadas foram eficazes contra *E. faecalis* após 7 dias. Menor contagem bacteriana foi observada para MICs associadas aos óleos essenciais em relação ao controle positivo (sem MIC) ($P < ,0001$). **Conclusões:** Medicação intracanal de HC associada aos óleos *Thyme* e *Lemongrass* mantém o pH alcalino e demonstra atividade antibacteriana contra *E. faecalis*.

Palavras-chave: Endodontia, *Enterococcus faecalis*, hidróxido de cálcio, medicação intracanal, óleos essenciais.

* Artigo escrito segundo normas do periódico *Journal of Endodontics*

Introdução

A infecção endodôntica é composta por uma microbiota polimicrobiana de micro-organismos aeróbios, anaeróbios, Gram-positivos e Gram-negativos organizados em biofilme (1). *Enterococcus faecalis* apresenta maior resistência aos antimicrobianos e é capaz de sobreviver nos túbulos dentinários (2), sendo predominante em dentes com insucesso do tratamento endodôntico (3).

O emprego da medicação intracanal (MIC) visa à complementação da desinfecção do sistema de canais radiculares (4). O hidróxido de cálcio (HC) é amplamente utilizado por apresentar excelentes propriedades biológicas e atividade antimicrobiana (5). A difusão dos íons hidroxila através dos túbulos dentinários até a superfície externa da raiz favorece seu efeito antimicrobiano no sistema de canais radiculares (6). Antimicrobianos como o paramonoclorofenol canforado (PMCC) e Clorexidina (CLX) são associados ao HC para ampliar sua atuação em micro-organismos resistentes (7, 8). CLX apresenta atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e sobre espécies fúngicas (9) e é usada como MIC em associação a outras substâncias (10), apresentando efeito sinérgico quando associada ao HC (7).

Óleos essenciais apresentam origem natural e são estudados em função de sua ação antimicrobiana/antibiofilme (11). O óleo essencial do gênero *Thymus vulgaris* é composto por timol, apresentando vestígios de *carvacrol*, e é reconhecido pela sua ação antimicrobiana (bactericida e fungicida) (12). Esses compostos apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana e atividade antibiofilme (13). O óleo essencial *Thyme* demonstra efetividade sobre todas as espécies *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* e *Candida albicans* (13).

A espécie *Cymbopogon citratus* é conhecida por erva-cidreira ou *Lemongrass*. A atividade antimicrobiana/antibiofilme do óleo de *Lemongrass* foi demonstrada em várias concentrações contra 5 cepas de *Staphylococcus aureus*, sendo 3 cepas susceptíveis e 2 cepas resistentes a metilicina, assim como seu alto potencial para inibir a formação e desestruturação do biofilme (14).

O objetivo desse estudo foi avaliar o pH e atividade antibacteriana de MICs à base de HC em associação aos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme* comparados com as associações com CLX e PMCC.

Materiais e Métodos*

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-UNESP – CAAE nº 77793417.4.0000.5416 (ANEXO A).

Avaliação do pH

Tubos de polietileno (n =10 por grupo) com 10 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro interno foram preenchidos com as MICs (Tabela 1). Os tubos foram imersos em 10 mL de água destilada em frascos plásticos mantidos em estufa a 37°C. Após cada período de avaliação, os tubos foram removidos e colocados em novos frascos com água destilada. Como grupo controle foi utilizada água destilada e deionizada (n =10). As mensurações foram realizadas após 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias a uma temperatura de 25°C. O valor de pH das soluções foi determinado com pHmetro digital (Digimed DM-21, Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,01; 6,86 e 10,01. A mensuração foi aferida 3 vezes, obtendo média dos valores de pH de cada espécime (15).

Avaliação ex vivo da atividade antibacteriana

Padronização dos espécimes

Foram utilizados 72 incisivos inferiores humanos unirradiculares com canal único e reto. Os dentes foram radiografados nos sentidos vestibulo-lingual e mesio-distal e a superfície externa foi observada em microscópio óptico para detectar trincas e/ou fraturas. Foram incluídos dentes com anatomia similar sem trincas nem fraturas radiculares. As coroas foram seccionadas em máquina de precisão Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), padronizando o comprimento radicular em 15 mm.

A abertura foraminal foi padronizada com lima tipo K #25. Os canais radiculares foram preparados com o sistema rotatório MTwo (VDW, Munich, Alemanha) até o instrumento #40/.04, 1 mm aquém do comprimento total do dente. A irrigação foi realizada com 2 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% a cada troca de instrumento. Os canais radiculares foram inundados com EDTA 17% por 3 minutos seguido da irrigação final com 5 mL de solução salina. A região apical foi selada com resina composta fotopolimerizável (3M ESPE, St. Paul, EUA) e a superfície radicular externa impermeabilizada com adesivo epóxi

* APÊNDICE A

Araldite (Brascola, Joinville, SC, Brasil), exceto na superfície de corte. Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em placas de cultura de 24 poços e fixados com resina acrílica ativada quimicamente, para posterior esterilização em óxido de etileno (Acecil, Campinas, SP, Brasil), conforme estudo anterior (10). As MICs avaliadas foram divididas em 5 grupos experimentais (n = 10) e 2 grupos controles (n = 11), conforme Tabela 1.

Tabela 1. Medicações intracanal (MICs) e suas composições

MICs	Composição
HC	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 (Calen®)*
HC-LE	Hidróxido de cálcio + (Calen®)* + <i>Lemongrass</i> 2%**
HC-TH	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 (Calen®)* + <i>Thyme</i> 2%**
HC-PMCC	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 + PMCC (Calen PMCC®)*
HC-CLX	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 (Calen®)* + CLX 0,4%**
C+	Sem MIC (dentes contaminados)
C-	Meio de cultura estéril (dentes sem contaminação)

*S. S. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brasil, **Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Nº de catálogo: *Lemongrass*- 61800; *Thyme* - W306509; CLX: Solução de digluconato de clorexidina-20% em água, C9394, Lot #BCBK1284V. As associações HC-LE, HC-TH e HC-CLX foram manipuladas na proporção de 2% e 0,4% peso/peso, respectivamente.

Contaminação dos espécimes

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil) conforme metodologia descrita por Lima et al (10). Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29212) ajustada em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) na concentração equivalente a 10^8 UFC mL⁻¹ foi utilizada. A pureza das culturas foi confirmada por morfologia macroscópica (placas com ágar) e microscópica (Coloração de Gram). Os canais radiculares foram contaminados com 20 µL de inóculo bacteriano e incubados em microaerofilia (jarra de anaerobiose) a 37°C ± 1°C por 21 dias. A cada 2 dias, meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) esterilizado foi adicionado no interior dos canais radiculares. Após o período de incubação, foi realizada a coleta inicial (C1) para confirmação da contaminação por *E. faecalis*, utilizando dois cones de papel absorvente estéreis #40 (Tanari Industrial Ltda, São Paulo, SP, Brasil), por um minuto cada, transferindo-os para microtubos de polietileno de 1,5 mL contendo solução salina estéril (NaCl a 0,85%).

Os microtubos foram agitados em vortex por 1 minuto antes da realização da diluição decimal seriada e plaqueamento.

Inserção das Medicções Intracanal (MICs)

Todas as associações (HC-LE, HC-TH e HC-CLX) foram manipuladas 24 horas antes da realização dos experimentos, e permaneceram estáveis para aplicação. Após C1, os canais radiculares foram reinstrumentados com lima tipo K #40 e irrigados com solução salina estéril. A seguir, os canais radiculares foram inundados com solução de EDTA 17% por 3 minutos e irrigados com 5 mL de solução salina estéril. Os canais foram secos com pontas de papel absorvente e as MICs foram inseridas com auxílio de agulha e seringa (10). Uma bolinha de algodão esterilizada foi adaptada nas entradas dos canais radiculares e os espécimes foram incubados em microerofilia a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias. Além dos grupos experimentais, foram utilizados um controle positivo (C+) que não recebeu nenhuma MIC, demonstrando a viabilidade bacteriana durante o experimento; e um controle negativo (C-), contendo apenas meio de cultura estéril, para comprovar a eficácia da esterilização.

Coletas e análise microbiológicas

A remoção das MICs foi realizada com limas tipo K #40 e os canais radiculares foram irrigados com 10 mL de solução salina estéril. Foi utilizado 1 mL de neutralizante específico para cada MIC (16), conforme Tabela 2. A irrigação final foi realizada com 1 mL de solução salina estéril e em seguida foi realizada a coleta pós-medicação (C2).

Tabela 2. Neutralizantes utilizados para cada MIC

MICs	Neutralizador
HC	0,5% de ácido cítrico
HC-LE	0,5% de ácido cítrico
HC-TH	0,5% de ácido cítrico
HC-PMCC	0,5% de ácido cítrico
HC-CLX	0,5% de ácido cítrico/Tween 80 + 0,07% de leticinina de soja

Após C2, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril. Os espécimes foram incubados em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, em microerofilia, por mais 7 dias. Após este período realizou-se a coleta final (C3) para verificação de possível recolonização do canal radicular principal. Após diluição decimal seriada, alíquotas de 20 μL de cada diluição foram plaqueadas em placas de Petri, contendo *Tryptic Soy Ágar* (Tsa - Difco). As placas foram

incubadas em microerofilia a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. O crescimento microbiano foi determinado por contagem de UFC mL^{-1} em todas as coletas.

Análise Estatística

Os dados dos valores de pH obtidos foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. Os dados obtidos na avaliação antimicrobiana foram submetidos à transformação logarítmica e analisados estatisticamente por meio dos testes ANOVA e Tukey (C1 e C2) ou Kruskal-Wallis e Dunn (C3).

Resultados

pH

A Tabela 3 apresenta os valores da média e desvio padrão dos valores de pH das MICs à base de HC avaliadas nos diferentes períodos experimentais, em comparação com o controle (H_2O – água destilada e deionizada).

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores de pH das MICs nos diferentes períodos

Períodos	HC	HC-LE	HC-TH	HC-PMCC	HC-CLX	C (H_2O)
12 h	11,46 ^a ($\pm 0,17$)	11,41 ^a ($\pm 0,28$)	10,19 ^b ($\pm 0,92$)	11,25 ^a ($\pm 0,26$)	11,52 ^a ($\pm 0,25$)	6,84 ^c ($\pm 0,48$)
1 dia	10,57 ^a ($\pm 0,33$)	10,75 ^a ($\pm 0,15$)	10,50 ^a ($\pm 0,33$)	10,44 ^a ($\pm 0,26$)	10,47 ^a ($\pm 0,57$)	6,74 ^b ($\pm 0,35$)
3 dias	10,76 ^a ($\pm 0,52$)	10,61 ^a ($\pm 0,75$)	10,23 ^a ($\pm 0,56$)	10,31 ^a ($\pm 0,96$)	10,26 ^a ($\pm 0,96$)	6,81 ^b ($\pm 0,41$)
7 dias	10,62 ^a ($\pm 0,89$)	10,95 ^a ($\pm 0,68$)	10,69 ^a ($\pm 0,71$)	10,49 ^a ($\pm 0,68$)	10,85 ^a ($\pm 0,70$)	6,70 ^b ($\pm 0,39$)
14 dias	10,07 ^{a,b} ($\pm 1,04$)	10,90 ^a ($\pm 0,82$)	9,7 ^b ($\pm 0,66$)	10,03 ^{a,b} ($\pm 0,97$)	10,06 ^{a,b} ($\pm 0,90$)	6,52 ^c ($\pm 0,30$)
21 dias	9,44 ^a ($\pm 1,14$)	9,30 ^a ($\pm 0,85$)	9,68 ^a ($\pm 0,86$)	9,83 ^a ($\pm 1,22$)	9,24 ^a ($\pm 1,24$)	6,61 ^b ($\pm 0,39$)
28 dias	9,71 ^a ($\pm 1,0$)	9,37 ^a ($\pm 1,06$)	9,47 ^a ($\pm 0,99$)	9,76 ^a ($\pm 0,94$)	8,91 ^a ($\pm 0,71$)	6,59 ^b ($\pm 0,18$)

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa entre as medicações intracanal no mesmo período. ANOVA e Tukey ($P < ,05$). C; controle (água deionizada).

Todas as MICs apresentaram valor de pH maior que 10,0 até 7 dias, sem diferença estatística significativa entre elas, exceto o HC-TH que apresentou menor valor nas primeiras 12 horas ($P < ,05$). No período de 14 dias, houve diferença estatística significante entre as MICs associadas aos óleos essenciais ($P < ,05$), sendo que HC-TH apresentou o menor valor de pH (9,7) e HC-LE mostrou o maior valor (10,9). Nos períodos de 21 e 28 dias, os valores de pH não apresentaram diferença estatística ($P > ,05$).

Atividade antibacteriana

A Tabela 4 apresenta os valores da média e desvio padrão da contagem de UFC mL⁻¹ (log₁₀) das MICs à base de HC. Na coleta inicial (C1) não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > ,05$). O grupo controle negativo (C-) não mostrou crescimento bacteriano durante a realização do experimento. A viabilidade bacteriana no grupo controle positivo (C+) foi confirmada ao longo de todo o período experimental, como é mostrado nas coletas C1, C2 e C3. Na coleta pós-medicação (C2) não houve crescimento bacteriano nos grupos experimentais, sendo estatisticamente diferentes do C+ ($P < ,05$). Na coleta final (C3), houve aumento da contagem bacteriana em todos os grupos experimentais, porém mostraram diferença estatística com o C+ ($P < ,05$). As associações HC-LE e HC-TH apresentaram menor contagem bacteriana ($P < ,0001$).

A contagem UFC mL⁻¹ entre coletas demonstrou diferença estatística significativa entre as coletas C1 e C3 em todos os grupos experimentais. Ainda, o grupo C+ não demonstrou diferença estatística significativa em todas as coletas.

Tabela 4. Média e desvio padrão da contagem de UFC mL⁻¹_{log 10} nas coletas microbiológicas

Coletas	HC	HC-LE	HC-TH	HC-PMCC	HC-CLX	C+
C1*	6,62 ^{a,A} (±0,49)	6,73 ^{a,A} (±0,25)	6,37 ^{a,A} (±0,35)	6,50 ^{a,A} (±0,46)	6,27 ^{a,A} (±0,42)	6,76 ^{a,A} (±0,13)
C2*	0,00 ^{b,B} (±0,00)	0,00 ^{b,B} (±0,00)	0,00 ^{b,B} (±0,00)	0,00 ^{b,B} (±0,00)	0,00 ^{b,B} (±0,00)	6,78 ^{a,A} (±0,097)
C3**	1,96 ^{b,B} (±1,07)	0,34 ^{c,B**} (±0,77)	0,38 ^{c,B**} (±0,83)	1,94 ^{b,B} (±1,04)	1,99 ^{b,B} (±1,07)	6,81 ^{a,A} (±0,07)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa entre as MICs na mesma coleta. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significante entre as coletas. C1 e C2: ANOVA e Tukey ($P < ,05$)*; C3: Kruskal-Wallis e Dunn ($P < ,0001$)**.

Discussão

O presente estudo demonstra que a associação de hidróxido de cálcio aos óleos essenciais de *Lemongrass* e *Thyme* manteve o pH alcalino do HC, e mostra capacidade de reduzir a contagem bacteriana em dentes contaminados com *E. faecalis*. Este micro-organismo foi usado neste estudo por ser prevalente nos insucessos do tratamento endodôntico (17), com capacidade de penetrar no interior dos túbulos dentinários (18) e de resistir aos antimicrobianos empregados como MIC (19). Como comparação, foram utilizadas associações do HC com antimicrobianos PMCC ou CLX (20, 21). O presente estudo demonstra efetiva ação antibacteriana das associações de HC (Calen®) com os óleos *Lemongrass* e *Thyme* (HC-LE e HC-TH) que apresentaram maior redução bacteriana em comparação a MIC de HC (Calen®) e associações com PMCC e CLX.

Outros óleos essenciais (*Aloe vera* e *Z. multiflora*) foram estudados em associação ao HC demonstrando redução de percentual de micro-organismos após tempo de contato de 14 dias, em comparação à MIC de HC sem associação (22). Podemos ressaltar que óleos de *Aloe vera* e *Z. multiflora* apresentam *timol* e *carvacrol*, assim como o óleo essencial de *Thyme* (22). O mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais está associado à ruptura da membrana e aumento da permeabilidade (23, 24). A ruptura da membrana ocorre por meio de produtos lipofílicos dos óleos *carvacrol* e *Thyme* contra *E. coli* (24). A eficácia antimicrobiana do *Lemongrass* ou sua associação a íons de prata foi avaliada contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram-negativas (*E. coli* e *Moraxella catarrhalis*). As bactérias Gram-positivas foram mais susceptíveis ao óleo de *Lemongrass* e as Gram-negativas foram mais resistentes, isso pode ser explicado devido à presença de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas, o qual pode dificultar a penetração dos óleos hidrofóbicos pela membrana (25). Esse mecanismo pode estar relacionado aos resultados do presente estudo, onde foi demonstrada atuação sobre *E. faecalis*. O potencial antimicrobiano do *Lemongrass* pode ser associado aos componentes alfa e beta citral, que estão presentes promovendo o rompimento da membrana plasmática das bactérias e a liberação do conteúdo citoplasmático (26). A morte celular ocorre devido à ruptura da parede celular, perda de íons e redução do potencial da membrana (27).

A efetividade da ação biológica do HC depende de sua alcalinidade, pois é um dos principais fatores responsável pela ação antimicrobiana (28). A difusão dos íons hidroxila pelos túbulos dentinários promove pH elevado, atuando por contato direto ou indireto nos

micro-organismos (29). Esta atuação é influenciada pelos veículos e associações (30). O veículo tem como objetivo facilitar o uso do HC melhorando consistência e difusão de íons cálcio e hidroxila através dos túbulos dentinários (31). A pasta Calen® utilizada no presente estudo tem como veículo o polietilenoglicol 400, que permite a dissociação de íons (28). O efeito antimicrobiano das associações de HC depende da manutenção do pH alcalino (6, 30).

Nossos resultados demonstraram que todas as MICs associadas aos óleos mantiveram a alcalinidade e tiveram valores próximos de pH em comparação às MICs de HC, HC-PMCC e HC-CLX, mostrando que a associação aos óleos essenciais não interferem na alcalinidade da MIC e ainda conseguiram ser eficaz contra *E. faecalis*.

Óleos essenciais podem apresentar melhor efetividade em pH ácido, uma vez que, em baixos valores de pH os componentes dos óleos essenciais tendem a não dissociar e serem hidrofóbicos (32). No entanto, nossos resultados sugerem que o pH alcalino não prejudicou a atuação dos óleos, que nas associações permitiram maior efetividade antimicrobiana que o HC sozinho (C3). A adição da CLX ao hidróxido de cálcio também manteve pH alcalino, conforme já demonstrado (33). HC-CLX e HC-PMCC apresentaram valores de pH semelhantes, conforme já observado (10). No presente estudo, o óleo essencial de *Thyme* demonstrou efetividade contra *E. faecalis*, estando de acordo com avaliação do óleo contra cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, por meio do teste de difusão de ágar (34). Essa ação antimicrobiana pode ser associada à presença de *timol* e *carvacrol*, potentes agentes antimicrobianos (35). *Carvacrol* e *timol* têm suas estruturas muito parecidas, diferenciando apenas no local do grupo hidroxila do anel fenólico, porém ambos tornam a membrana celular das bactérias permeável. A Efetividade do *carvacrol* e *timol* foi demonstrada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tais como *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente (36).

A efetividade antibacteriana das associações com os óleos essenciais usadas como MIC neste estudo foi observada após 7 dias (C3), onde houve maior redução da contagem bacteriana do que as outras associações (HC-PMCC e HC-CLX). O potencial antimicrobiano de MICs à base de HC (Calen®) associado à PMCC e CLX em estudo com metodologia similar foi observado após período de 14 dias (10). Desta forma, as associações com óleos podem diminuir o tempo clínico necessário, potencializando a efetividade da MIC à base de HC. Em conclusão, os óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme* não interferem no pH das MICs à base de HC, mantendo o pH alcalino, e apresentam atividade antibacteriana contra *E. faecalis*.

Todas as MICs foram capazes de diminuir a contagem bacteriana, com destaque para associação do HC aos óleos de *Lemongrass* e *Thyme*, que mostraram uma maior atuação.

Referências

1. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277-88.
2. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.
3. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.
4. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, da Silva LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod* 2002;28:295-9.
5. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011;44:697-730.
6. Andreasen J, Christensen S. Relationship between calcium hydroxide pH levels in the root canals and periodontal healing after replantation of avulsed teeth. *Endod Topics* 2006;14:93-101.
7. Essawi T, Srouf M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;70:343-9.
8. Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod* 2007;33:667-72.
9. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, et al. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J* 2013;24:89-102.
10. Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2012;45:311-6.
11. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86:985-90.
12. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;88:308-16.

13. Boruga O, Jianu C, Misca C, et al. Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. J Med Life 2014;7 Spec No. 3:56-60.
14. Adukwu EC, Allen SC, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (Cymbopogon flexuosus) and grapefruit (Citrus paradisi) essential oils against five strains of Staphylococcus aureus. J Appl Microbiol 2012;113:1217-27.
15. Guerreiro-Tanomaru JM, Aguiar AS, Chávez-Andrade GM, Bernardi MIB, Tanomaru Filho M. Antibacterial activity of intracanal medications based on calcium hydroxide and zinc oxide micro- or nanoparticles: an ex vivo study. Rev Odontol UNESP 2017;46:153-7.
16. Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M. Antimicrobial Activity and pH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine. J Contemp Dent Pract 2015;16:624-9.
17. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. J Endod 2004;30:315-20.
18. Love RM. Bacterial adhesins--their role in tubule invasion and endodontic disease. Aust Endod J 2002;28:25-8.
19. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill Enterococcus faecalis in vitro. J Endod 2004;30:218-9.
20. Ercan E, Dalli M, Dulgergil 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:e27-31.
21. Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. Eur J Dent 2011;5:1-7.
22. Abbaszadegan A, Sahebi S, Gholami A, et al. Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with Enterococcus faecalis. J Investig Clin Dent 2016;7:93-101.
23. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1914-20.
24. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J Agric Food Chem 1998;46:3590-5.

25. Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 2015;22:657-65.
26. Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, et al. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J Appl Microbiol* 2010;109:1139-49.
27. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446-75.
28. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol* 2012;28:320-3.
29. Solak H, Oztan MD. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehabil* 2003;30:436-9.
30. Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio M, Lopez ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci* 2004;46:107-11.
31. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol* 2007;23:21-5.
32. Rivas L, McDonnell MJ, Burgess CM, et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol* 2010;139:70-8.
33. Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod* 2009;35:1274-7.
34. Sienkiewicz M, Lysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb Drug Resist* 2012;18:137-48.
35. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol* 2013;145:686-98.
36. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001;91:453-62.

3.2 Publicação 2

Difusão de íons hidroxila e atividade antibiofilme de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associadas a *Thyme* e *Lemongrass**

Resumo

Objetivo Avaliar a capacidade de difusão de íons hidroxila e atividade antibiofilme de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio (HC) em associação aos óleos *Thyme* e *Lemongrass*, comparadas às associações com paramonoclorofenol canforado (PMCC) e clorexidina (CLX).

Metodologia As medicações intracanal (MICs) avaliadas foram: Calen® (HC), Calen®+*Lemongrass* (HC-LE), Calen®+*Thyme* (HC-TH), Calen+PMCC® (HC-PMCC) e Calen®+CLX (HC-CLX). A difusão de íons hidroxila foi avaliada após preenchimento de canais radiculares de dentes bovinos pelas medicações. A análise de pH foi realizada nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A avaliação da atividade antibiofilme foi realizada por meio do teste de contato direto (TCD) sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em blocos de dentina radicular bovina. A análise foi realizada pela contagem de UFC mL⁻¹. Os dados foram analisados estatisticamente por meio dos testes ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$).

Resultados Os valores de pH de todas as MICs avaliadas foram similares durante todo o período experimental, sem diferença estatística entre elas a partir do 7º dia ($P > 0,05$). Todas as MICs promoveram diminuição em média de 68,96% da contagem bacteriana sobre biofilme de *E. faecalis* ($P > 0,05$) em comparação ao C+ ($P < 0,05$).

Conclusões *Thyme* e *Lemongrass* associados à pasta de HC não impedem a difusão de íons hidroxila, mantendo o pH alcalino, e são capazes de atuar sobre biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: biofilme, Endodontia, hidróxido de cálcio, medicação intracanal, óleos essenciais.

* Artigo escrito nas normas do periódico *International Endodontic Journal*

Introdução

A complexidade do sistema de canal radicular dificulta a completa eliminação dos micro-organismos (Gursoy *et al.* 2013). O uso de medicação intracanal (MIC) visa complementar a desinfecção promovida pelo preparo biomecânico, favorecendo o prognóstico endodôntico (Athanassiadis *et al.* 2007). Hidróxido de cálcio (HC) é o antimicrobiano mais empregado como MIC, devido a seu efeito antibacteriano baseado na capacidade de difusão de íons hidroxila e pH elevado (Mohammadi & Dummer 2011).

Enterococcus faecalis é a bactéria mais comumente isolada em casos de insucesso do tratamento endodôntico, devido sua capacidade de invadir túbulos dentinários e sobreviver em condições adversas (Evans *et al.* 2003, Stuart *et al.* 2006).

A medicação de HC apresenta menor efetividade frente aos micro-organismos resistentes como *E. faecalis* (Adl *et al.* 2015, Mohammadi *et al.* 2012, Siqueira & Lopes 1999). Desta forma, associações a outros antimicrobianos são propostas visando aumentar o espectro de ação da MIC, como a associação ao paramonoclorofenol canforado (PMCC) e clorexidina (CLX) (Signoretti *et al.* 2011, Siqueira *et al.* 2007).

A adição do PMCC ao HC não interfere nas suas propriedades físico-químicas, aumentando o seu espectro antimicrobiano (Siqueira & de Uzeda 1996), e ainda, permitem a liberação de íons cálcio e hidroxila. A manutenção do pH elevado, prolongando a liberação dos íons, é consequência da formação de paramonoclorofenolato de cálcio (Camargo *et al.* 2006) que ocorre na associação da pasta de HC ao PMCC. A associação da CLX ao HC proporciona um efeito sinérgico da CLX, mantendo o pH alcalino e a efetividade antimicrobiana (Gomes *et al.* 2009, Lima *et al.* 2012).

Óleos essenciais são produtos naturais que apresentam ação antimicrobiana/antibiofilme (Abbaszadegan *et al.* 2016), biocompatibilidade e diminuem efeitos colaterais de antimicrobianos sintéticos (Rios & Recio 2005). A erva natural do gênero *Thymus vulgaris*, popularmente conhecida como tomilho (*Thyme*) tem sido utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia por apresentar atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante, devido à presença de *timol* e *carvacrol*, potentes agentes antimicrobianos (Sajed *et al.* 2013). O potencial antimicrobiano de diversos tipos de óleos essenciais, incluindo o *Thyme*, contra uma variedade de bactérias foi avaliado, demonstrado que *Thyme* é eficaz contra *E. faecalis*. Apresenta ainda atuação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Ozogul *et al.* 2015).

A espécie *Cymbopogon citratus*, conhecida por vários nomes, entre eles erva-cidreira, capim limão ou *Lemongrass*, apresenta potencial antimicrobiano devido aos componentes presentes alfa e beta citral (de Oliveira *et al.* 2010). O potencial de ação do *Lemongrass* contra *E. faecalis* foi demonstrado (Hammer *et al.* 1999). A efetividade antibacteriana do óleo *Lemongrass* sobre bactérias Gram-positivas está relacionada à ausência de lipopolissacarídeos na sua membrana celular, e a capacidade dos óleos atravessarem essa membrana (Ahmad & Viljoen 2015). Devido a menor atuação do HC sobre micro-organismos resistentes, novas associações são propostas para aumentar seu espectro de ação.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de difusão de íons hidroxila e atividade antibiofilme de MICs à base de HC em associação aos óleos *Thyme* e *Lemongrass*, CLX e PMCC. As hipóteses nulas testadas foram: (1) as associações de MIC à base de HC com óleos essenciais interferem na difusão de íons hidroxila em dentina radicular bovina e; (2) não apresentam atividade antibiofilme sobre *E. faecalis* em comparação às associações com PMCC e CLX.

Material e métodos*

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP - Protocolo nº 35/2017 (ANEXO B). As MICs avaliadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Medicações intracanal (MICs) e suas composições

MICs	Composição
HC	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 (Calen®)*
HC-LE	Hidróxido de cálcio + (Calen®)* + <i>Lemongrass</i> 2%**
HC-TH	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 (Calen®)* + <i>Thyme</i> 2%**
HC-PMCC	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 + PMCC (Calen PMCC®)*
HC-CLX	Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietilenoglicol 400 (Calen®)* + CLX 0,4%**
C+	Sem MIC (dentes contaminados)
C-	Meio de cultura estéril (dentes sem contaminação)

*S. S. White Art. Dent. Ltda, RJ, Brasil, **Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Lemongrass-61800; *Thyme*-W306509; CLX: Solução de digluconato de clorexidina- 20% em água, C9394, Lot #BCBK1284V. As associações HC-LE, HC-TH e HC-CLX foram manipuladas 24 h antes do experimento na proporção de 2% e 0,4% peso/peso, respectivamente.

Difusão de íons hidroxila em dentina radicular bovina

A metodologia foi realizada de acordo com estudos prévios (Aguiar *et al.* 2015, Lima *et al.* 2012). Setenta e dois incisivos mandibulares bovinos com ápices completamente formados foram selecionados. As coroas dentárias foram seccionadas em máquina de corte Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e comprimento das raízes padronizado em 15 mm. Os espécimes foram submersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 48 horas e enxaguados em água destilada por 4 dias. O comprimento de trabalho foi estabelecido em 14 mm e a instrumentação do canal radicular foi realizada com limas tipo Kerr até a de nº 110 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguido do uso de brocas de Gates-Glidden número 5 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) no comprimento de 11 mm. Hipoclorito de sódio a 2,5% (Instituto de Química, Araraquara, UNESP – Brasil) foi utilizado como solução irrigadora com 2 mL a cada troca de lima e 5 mL ao final da instrumentação. EDTA trissódico a 17% (Odahcam Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) foi utilizada por 3 minutos, seguida da irrigação final com 5 mL de solução salina.

Uma cavidade com 4 x 2 x 0,5 mm (comprimento x largura x profundidade) foi confeccionada na superfície radicular proximal, entre 5 e 9 mm do ápice radicular com broca diamantada 1052 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) para padronização da espessura dentinária remanescente. Os espécimes foram mensurados e radiografados para garantir espessura uniforme de dentina entre a parede de fundo da cavidade e a parede interna do canal radicular. A superfície radicular externa foi impermeabilizada com adesivo epóxi (Brascola, Joinville, SC, Brasil) complementado por uma camada de esmalte para unhas, exceto na área da cavidade. Apenas os dentes do grupo controle negativo (C-), sem MIC, foram completamente impermeabilizados, incluindo a área da cavidade radicular.

Após a colocação das MICs com auxílio de seringa e agulha, a abertura do canal radicular foi selada com resina composta fotopolimerizável (3M ESPE, St. Paul, EUA) e impermeabilizada com adesivo epoxi Aradilte (Brascola, Joinville, SC, Brasil) e esmalte de unhas (Colorama, São Paulo, SP, Brasil). Após a secagem, os espécimes foram imersos em frascos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Estes frascos foram armazenados em estufa a 37°C e o pH da solução avaliado nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28 dias por meio de pHmetro digital (Digimed DM-22, Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) calibrado com pH 4, 7 e 10 à temperatura ambiente (25° C).

Teste de contato direto sobre biofilme

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil) sob condições assépticas. Foram confeccionados blocos de dentina radicular bovina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (comprimento x largura x espessura) usando máquina de corte de precisão Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Os blocos de dentina permaneceram em EDTA a 17% por 3 min e foram enxaguados abundantemente com água destilada. Em seguida, os blocos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2013).

Os blocos de dentina (n = 6 por grupo) foram distribuídos em placas de cultura celular de 24 poços. Cada poço recebeu 200 µL de inóculo de *E. faecalis*, onde foi adicionado 1,8 mL de meio de cultura estéril BHI e as placas permaneceram em incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), em microaerofilia, a 37°C por 15 dias. A cada 48 horas o meio BHI foi renovado.

Os blocos de dentina foram lavados duas vezes em solução salina a 0,85% para remoção das células não aderidas. Em placas de 48 poços foram colocadas 1 mL da suspensão das MICs na concentração de 25 mg/mL e os blocos permaneceram em contato durante 24 h, em estufa a 37°C. No grupo controle negativo foi utilizado solução salina estéril com a finalidade de verificar a viabilidade do biofilme durante o período de incubação. Posteriormente, os blocos contendo o biofilme remanescente foram lavados em solução salina estéril e, individualmente, armazenados em tubos de polietileno contendo 1 mL das soluções neutralizantes (Tabela 2), com a finalidade de evitar o efeito *carry-over* das MIC (Aguiar *et al.* 2015), e com pérolas de vidro ($3,50 \pm 0,2$) no seu interior.

Tabela 2. Neutralizantes utilizados para cada MIC

MICs	Neutralizador
HC	0,5% de ácido cítrico
HC-LE	0,5% de ácido cítrico
HC-TH	0,5% de ácido cítrico
HC-PMCC	0,5% de ácido cítrico
HC-CLX	0,5% de ácido cítrico/Tween 80 + 0,07% de leticinina de soja

Os tubos foram agitados em vortex (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 min a fim de promover o rompimento do biofilme aderido ao bloco de dentina. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada e alíquotas de 20 µL de

cada diluição foram plaqueadas em meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h para posterior contagem de UFC mL⁻¹.

Análise Estatística

Os dados obtidos dos valores de pH nos diferentes períodos foram submetidos à análise estatística por meio dos testes ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$). Os dados obtidos nos testes antimicrobianos foram submetidos à transformação logarítmica e analisados estatisticamente por meio dos testes ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Difusão de íons hidroxila

A Tabela 3 apresenta os valores da média e desvio padrão do pH das MICs à base de HC avaliadas nos diferentes períodos experimentais. Todos as medicações apresentaram pH com valores similares em todos os períodos avaliados, sendo diferentes do controle (água deionizada). O maior valor de pH foi para HC-PMCC no periodo de 1 dia, com diferença estatística significativa com os demais grupos ($P < 0,05$).

Tabela 3. Média e desvio padrão de pH de MICs à base de HC nos diferentes períodos

Períodos	HC	HC-LE	HC-TH	HC-PMCC	HC-CLX	Controle
1 dia	7,26 ^b	8,19 ^c	7,75 ^{b,c}	9,87 ^a	7,48 ^{b,c}	6,88 ^b
	(±0,54)	(±0,73)	(±0,19)	(±1,14)	(±0,47)	(±0,21)
3 dias	7,22 ^{b,c}	7,27 ^{b,c}	7,16 ^{b,c}	7,84 ^a	7,41 ^{a,b}	6,88 ^c
	(±0,41)	(±0,16)	(±0,14)	(±0,66)	(±0,60)	(±0,21)
7 dias	7,35 ^{b,c}	7,40 ^b	7,50 ^{a,b}	7,81 ^a	7,66 ^{a,b}	7,01 ^c
	(±0,33)	(±0,34)	(±0,27)	(±0,32)	(±0,37)	(±0,25)
14 dias	7,73 ^a	7,53 ^a	7,75 ^a	7,73 ^a	7,71 ^a	6,78 ^b
	(±0,33)	(±0,38)	(±0,28)	(±0,21)	(±0,42)	(±1,20)
21 dias	8,02 ^a	7,97 ^a	8,16 ^a	8,02 ^a	8,07 ^a	7,15 ^b
	(±0,33)	(±0,18)	(±0,30)	(±0,34)	(±0,39)	(±0,23)
28 dias	8,20 ^a	8,12 ^a	8,16 ^a	8,11 ^a	8,17 ^a	7,22 ^b
	(±0,24)	(±0,32)	(±0,29)	(±0,27)	(±0,33)	(±0,12)

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significante entre as MICs de HC no mesmo periodo experimental. ANOVA e Tukey ($P < 0,05$).

Os valores de pH entre as MICs apresentaram diferença estatisticamente significativa nos períodos iniciais (1, 3 e 7 dias). No período experimental de 7 dias, HC-TH apresentou valor de pH semelhante ao HC-PMCC e HC-CLX sem diferença estatística significativa ($P > 0,05$). A partir do período de 14 dias, as MICs apresentaram valores similares, sem diferença estatística significativa entre elas, apenas com o grupo C- (sem MIC).

Teste de contato direto sobre biofilme

A Tabela 4 mostra os resultados da ação antimicrobiana sobre biofilme de *E. faecalis* após 24 h de contato. Todas as MICs foram capazes de reduzir a contagem bacteriana com diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo C+ ($P > 0,05$).

Tabela 4. Média e desvio padrão de UFC mL⁻¹ (log₁₀) após 24 h de contato com biofilme de *E. faecalis*

MICs	HC	HC-LE	HC-TH	HC-PMCC	HC-CLX	C+ (salina)
Contagem bacteriana	5,26 (±0,60) ^b	5,42 (±0,57) ^b	4,70 (±0,12) ^b	5,38 (±0,28) ^b	5,33 (±0,52) ^b	7,57 (±0,23) ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significante. ANOVA e Tukey ($P < 0,05$).

Discussão

O presente estudo demonstra que a associação de óleos essenciais de *Lemongrass* e *Thyme* ao HC não interfere na difusão de íons hidroxila na dentina bovina, e ainda manteve o pH alcalino das MICs. Além disso, a associação dos óleos foi capaz de atuar na diminuição da contagem de UFC mL⁻¹ após 24 horas de contato.

E. faecalis foi utilizado pela sua maior prevalência em casos de insucesso do tratamento endodôntico (Rocas *et al.* 2004). O efeito antimicrobiano das medicações intracanal de HC depende da liberação de íons hidroxila e do pH alcalino (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2012). A difusão dos íons hidroxila deve ocorrer pelos túbulos dentinários nas paredes do canal radicular (Komabayashi *et al.* 2009). Esta dissociação de íons pelas MICs à base de HC é dependente do veículo e das associações realizadas (Pacios *et al.* 2004). O veículo visa melhorar a consistência clínica do HC, além de promover difusão de íons cálcio e hidroxila através dos túbulos dentinários (Zmener *et al.* 2007). A pasta Calen® utilizada nesse estudo possui veículo viscoso de polietilenoglicol 400, e permite dissociação de íons (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2012).

No presente estudo, MIC de HC-PMCC no período de 1 dia apresentou maior valor de pH comparada aos demais grupos. E ainda, foi a mais efetiva para a dissociação de íons até 7 dias, concordando com estudo prévio (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2012). A maior liberação de íons hidroxila do HC-PMCC pode ser explicada pela formação de paramonoclorofenolato de cálcio, que promove liberação de íons de forma gradual e contínua (Camargo *et al.* 2006). A partir do período experimental de 14 dias houve aumento dos valores de pH para todas as MICs. Sendo assim, a associação aos óleos essenciais manteve a alcalinidade da MIC à base de HC, possibilitando a efetividade da ação antimicrobiana e da difusão de íons.

Óleos essenciais apresentam ação antimicrobiana/antibiofilme (Abbaszadegan *et al.* 2016). A avaliação de 52 extratos de óleos essenciais em 6 espécies de micro-organismos mostrou que *Lemongrass* e *Thyme* apresentam potencial contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (Hammer *et al.* 1999). A avaliação do óleo de *Thyme* contra cepas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *E. faecalis*, demonstra eficácia antimicrobiana do óleo (Melo *et al.* 2015). A eficácia antibacteriana da associação do HC aos óleos essenciais de *Aloe vera* e *Z. multiflora* contra *E. faecalis* foi demonstrada com maior redução bacteriana após tempo de contato de 14 dias (Abbaszadegan *et al.* 2016). No entanto, são necessários estudos que avaliem a ação antimicrobiana da associação de MIC à base de HC com os óleos essenciais de *Lemongrass* e *Thyme*.

A eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais sobre biofilme de *E. faecalis* em blocos de dentina radicular bovina foi avaliada para verificar a efetividade sobre biofilme, conforme modelo proposto em estudo prévio (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2013). Estudos anteriores demonstraram que óleos essenciais de *Lemongrass* e *Thyme* apresentam ação antimicrobiana sobre *E. faecalis* (Hammer *et al.* 1999, Melo *et al.* 2015). O presente estudo demonstra que ambos os óleos foram capazes de atuar no biofilme de *E. faecalis* após 24 h de contato. A efetividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Lemongrass* e *Toranja* contra biofilme de *S. aureus* também foi demonstrada (Adukwu *et al.* 2012). O óleo essencial de *Thyme* foi mais eficaz do que antibióticos na erradicação de biofilmes de *Pseudomonas* e *S. aureus* (Kavanaugh & Ribbeck 2012).

As associações de óleos essenciais com MICs à base de HC mostram potencial para uso clínico uma vez que apresentaram atuação contra biofilme de *E. faecalis* e possibilitam difusão de íons hidroxila.

Conclusão

Os óleos essenciais *Thyme* e *Lemongrass* mantem a capacidade de difusão de íons hidroxila da MIC de HC em dentina radicular bovina, mantendo o pH alcalino. Além disso, as MICs com os óleos essenciais apresentam atividade antibiofilme sobre *E. faecalis*.

Referências

- Abbaszadegan A, Sahebi S, Gholami A *et al.* (2016) Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with Enterococcus faecalis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* **7**, 93-101.
- Adl A, Motamedifar M, Shams MS, Mirzaie A (2015) Clinical investigation of the effect of calcium hydroxide intracanal dressing on bacterial lipopolysaccharide reduction from infected root canals. *Australian Endodontic Journal* **41**, 12-6.
- Adukwu EC, Allen SC, Phillips CA (2012) The anti-biofilm activity of lemongrass (Cymbopogon flexuosus) and grapefruit (Citrus paradisi) essential oils against five strains of Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 1217-27.
- Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M (2015) Antimicrobial Activity and pH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine. *Journal of Contemporary Dental Practice* **16**, 624-9.
- Ahmad A, Viljoen A (2015) The in vitro antimicrobial activity of Cymbopogon essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* **22**, 657-65.
- Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ (2007) The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal* **52**, S64-82.
- Camargo CH, Bernardineli N, Valera MC *et al.* (2006) Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dental Traumatology* **22**, 302-6.
- de Oliveira MM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH (2010) Biofilm formation by Listeria monocytogenes on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**, 97-106.

- Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T (2003) Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *Journal of Endodontics* **29**, 338-9.
- Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME (2009) Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* **35**, 1350-3.
- Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M (2012) Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dental Traumatology* **28**, 320-3.
- Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M (2013) Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of Endodontics* **39**, 346-50.
- Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S (2013) Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical Oral Investigation* **17**, 1113-25.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 985-90.
- Kavanaugh NL, Ribbeck K (2012) Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4057-61.
- Komabayashi T, D'Souza R N, Dechow PC, Safavi KE, Spangberg LS (2009) Particle size and shape of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* **35**, 284-7.
- Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M (2012) Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* **45**, 311-6.
- Melo AD, Amaral AF, Schaefer G *et al.* (2015) Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Canadian Journal of Veterinary Research* **79**, 285-9.
- Mohammadi Z, Dummer PM (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal* **44**, 697-730.
- Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M (2012) Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Medical Journal* **48**, 133-40.
- Ozogul Y, Kuley E, Ucar Y, Ozogul F (2015) Antimicrobial Impacts of Essential Oils on Food Borne-Pathogens. *Recent Patents of Food, Nutrition & Agriculture* **7**, 53-61.

- Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio M, Lopez ME (2004) Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *Journal of Oral Science* **46**, 107-11.
- Rios JL, Recio MC (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 80-4.
- Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics* **30**, 315-20.
- Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M (2013) *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *Journal of Ethnopharmacology* **145**, 686-98.
- Signoretto FG, Gomes BP, Montagner F, Barrichello Tosello F, Jacinto RC (2011) Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **111**, 653-8.
- Siqueira JF, Jr., de Uzeda M (1996) Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics* **22**, 674-6.
- Siqueira JF, Jr., Lopes HP (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal* **32**, 361-9.
- Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN (2007) Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *Journal of Endodontics* **33**, 667-72.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* **32**, 93-8.
- Zmener O, Pameijer CH, Banegas G (2007) An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dental Traumatology* **23**, 21-5.

4 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que a associação de MICs à base de HC com óleos essenciais mantem o pH alcalino e apresenta efetividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. Além disso, HC associado aos óleos essenciais apresenta efetividade antibiofilme sobre *E. faecalis* após 24 horas de contato direto. A adição dos óleos essenciais *Thyme* e *Lemongrass* ao HC (Calen®) não interferiu na capacidade de difusão de íons hidroxila, sendo similar à associação com PMCC e CLX.

E. faecalis é o micro-organismo de maior prevalência em casos de insucesso do tratamento endodôntico¹⁹, devido sua capacidade de penetrar pelos túbulos dentinários e se alojar em espaços onde instrumentos não são capazes de atingir¹⁷. Além disso, esse micro-organismo tem capacidade de resistir a antimicrobianos, como o hidróxido de cálcio, produto de escolha utilizado na medicação intracanal para complementar a desinfecção do canal radicular⁶¹.

Com objetivo de aumentar o espectro de ação do HC, outros antimicrobianos têm sido associados, como PMCC e CLX, demonstrando efetividade antimicrobiana quando associado à pasta a base de HC^{62,63}.

Óleos essenciais vêm sendo estudados por apresentarem potencial antimicrobiano/antibiofilme. O potencial antimicrobiano dos óleos de *Lemongrass* e *Thyme* sobre biofilme foi demonstrado, assim como na redução do biofilme⁶⁰.

Nossos resultados demonstraram que óleo essencial *Thyme* apresenta efetividade contra *E. faecalis*. A ação do *Thyme* foi demonstrada sobre cepas de micro-organismos dos gêneros: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, e *Pseudomonas* por meio do teste de difusão em ágar e difusão em disco⁶⁴. Essa ação antimicrobiana pode ser associada à presença de *timol* e *carvacrol*, potentes agentes antimicrobianos⁶⁵. *Carvacrol* e *timol* têm suas estruturas muito parecidas, diferenciando apenas no local do grupo hidroxila do anel fenólico, porém ambos tornam a membrana celular das bactérias permeável, segundo uma pesquisa que avaliou a atividade antimicrobiana do *Thyme* contra as bactérias Gram-positivas *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, por meio de microscopia de varredura confocal a laser, e fluxo de íons potássio e fosfato e concentração inibitória mínima⁵⁵.

Os resultados da nossa pesquisa demonstraram efetividade do óleo *Lemongrass* frente à *E. faecalis*. O potencial antimicrobiano do *Lemongrass* sozinho ou em associação à íons de prata foi demonstrado contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*,

C. albicans e *Candida tropicallis*, por meio da concentração inibitória mínima⁶⁶. Esse potencial antimicrobiano pode ser associado aos componentes presentes alfa e beta citral⁵⁸. O componente citral age alterando a estrutura da membrana plasmática, fazendo com que a mesma se rompa e libere o conteúdo citoplasmático⁶⁷. O efeito final é a morte celular devido à ruptura da parede celular, perda de íons, redução do potencial da membrana e outros fatores⁶⁸.

A alcalinidade é fator essencial para uma efetiva ação biológica e antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio, pois a difusão dos íons hidroxila pelos túbulos dentinários, possibilita ação antimicrobiana no sistema de canais radiculares¹¹. A difusão de íons é dependente do veículo e das associações utilizadas na pasta à base de HC⁶⁹. O veículo tem como objetivo facilitar o uso clínico do HC, bem como possibilitar a difusão de íons cálcio e hidroxila pelos túbulos dentinários³³. Nesse estudo foi utilizada a Pasta Calen® que tem como veículo o polietilenoglicol 400, que promove adequada difusão de íons cálcio e hidroxila⁷⁰.

O presente estudo encontrou valores similares de pH em todos os períodos experimentais e entre todas as MICs. Resultados para PMCC e CLX foram semelhantes em estudos publicados⁴⁷. A associação aos óleos essenciais não interferiu na alcalinidade do HC, mantendo-se, dessa forma, a efetividade da ação antimicrobiana dos óleos conforme resultados da C3, mesmo eles possuindo melhor efetividade em pH ácido⁷¹.

Nossos resultados mostraram efetiva ação antibacteriana das associações do HC com os óleos *Lemongrass* e *Thyme* (HC-LE e HC-TH), houve maior redução bacteriana em comparação a MIC de HC (Calen®) e associações com PMCC e CLX. Outros óleos essenciais (*Aloe Vera* e *Z. Multiflora*) são estudados em associação ao HC demonstrando uma maior redução de percentual de micro-organismos após tempo de contato de 14 dias, em comparação à MIC de HC sem associação⁷². Esse resultado pode estar relacionado com nossos resultados, uma vez que óleos de *Aloe Vera* e *Z. Multiflora* apresentam timol e *carvacrol*, assim como o óleo essencial de *Thyme*^{65,72}.

Nossos resultados demonstraram ação antibiofilme dos óleos essenciais sobre biofilme de *E. faecalis* após 24 horas de contato. Estudos anteriores demonstraram ação antimicrobiana dos óleos de *Lemongrass* e *Thyme* sobre *E. faecalis*^{56,73}. A maior efetividade antibacteriana das associações com os óleos essenciais usadas como MIC foi observada após 7 dias de utilização, conforme demonstrado nas coletas pós-medicação e final (7 dias após a remoção das MICs). As associações com os óleos *Lemongrass* e *Thyme* mostraram menor contagem bacteriana, e redução bacteriana maior que as outras associações (HC-PMCC e HC-CLX). O

potencial antimicrobiano de MICs à base de HC associado à PMCC e CLX, em estudo com metodologia similar, foi maior após período de 14 dias⁴⁷. Desta forma, a associação com óleos poderia diminuir o tempo necessário para efetividade da MIC de HC. No entanto, mais estudos são necessários com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade e possível ação clínica das associações de MICs à base de HC com óleos essenciais.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- a. As associações dos óleos essenciais *Lemongrass* e *Thyme* mantem o pH alcalino das MICs à base de HC, e apresentam atividade antibacteriana contra *E. faecalis*.
- b. Todas as MICs (HC, HC-PMCC, HC-CLX, HC-LE e HC-TH) foram capazes de diminuir a contagem bacteriana após 7 dias de remoção das mesmas. No entanto, foi observada menor contagem bacteriana para associação do HC aos óleos de *Lemongrass* e *Thyme* (HC-LE e HC-TH, respectivamente).
- c. As associações dos óleos essenciais *Thyme* e *Lemongrass* não impedem a capacidade de difusão em dentina de íons hidroxila da MIC à base de HC em dentina radicular bovina, mantendo o pH alcalino.
- d. Óleos essenciais em associação com MIC à base de HC demonstraram eficácia sobre biofilme de *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS*

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20(1): 340-9.
2. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 348-81.
3. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006; 39(4): 249-81.
4. Siqueira JF, Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J.* 2003; 36(7): 453-63.
5. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.
6. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990; 16(12): 580-8.
7. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987; 13(1): 29-39.
8. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics.* 2003; 6(1): 3-28.
9. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
10. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
11. Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human beta-defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod.* 2012; 38(3): 351-6.
12. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28(1): 12-55.
13. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2014; 40(2): 285-90.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

14. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(2): 231-52.
15. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012; 38(8): 1040-52.
16. Siqueira JFJ, Rôças IN, Ricucci D. Biofilm in endodontic infection. *Endod Topics* 2010; 22(1): 33-49.
17. Love RM. Bacterial adhesins--their role in tubule invasion and endodontic disease. *Aust Endod J.* 2002; 28(1): 25-8.
18. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(2): 100-3.
19. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
20. Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 579-86.
21. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1): 1-11.
22. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren 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.
23. Chavez de Paz LE, Davies JR, Bergenholtz G, Svensater G. Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. *Int Endod J.* 2015; 48(10): 916-25.
24. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1(5): 170-5.
25. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, da Silva LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002; 28(4): 295-9.
26. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011; 44(8): 697-730.
27. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988; 14(3): 125-7.

28. Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J.* 2008; 41(11): 933-8.
29. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod.* 2006; 32(12): 1142-5.
30. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36(11): 733-9.
31. Andreasen J, Christensen S. Relationship between calcium hydroxide pH levels in the root canals and periodontal healing after replantation of avulsed teeth. *Endod Topics.* 2006; 14(1): 93-101.
32. Tanomaru-Filho M, Sacaki JN, Faleiros FB, Guerreiro-Tanomaru JM. pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(1): 1-5.
33. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol.* 2007; 23(1): 21-5.
34. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35(3): 221-8.
35. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(4): 234-9.
36. Siqueira JF, Jr., 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.
37. Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007; 33(6): 667-72.
38. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2002; 28(2): 102-4.
39. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J.* 2003; 36(2): 100-5.
40. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35(9): 735-9.
41. Naumovich DB. Surface tension and pH of drugs in root canal therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963; 16(8): 965-8.

42. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 27(7): 452-5.
43. Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira Cda C, et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod.* 2012; 38(9): 1249-52.
44. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 89-102.
45. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009; 35(10): 1350-3.
46. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 411-8.
47. Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 311-6.
48. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94(3): 223-53.
49. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(6): 1914-20.
50. Onawunmi GO, Yisak WA, Ogunlana EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J Ethnopharmacol.* 1984; 12(3): 279-86.
51. Rota CM, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antibacterial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* 2008; 19(7): 681-7.
52. Essawi T, Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70(3): 343-9.
53. Dorman HJ, Deans SG. Antibacterial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(2): 308-16.
54. Nostro A, Sudano Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 4): 519-23.
55. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 453-62.
56. Melo AD, Amaral AF, Schaefer G, Luciano FB, de Andrade C, Costa LB, et al. Antibacterial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Can J Vet Res.* 2015; 79(4): 285-9.

57. Cardoso MJ, Carvalho Leal HW, Santos MX. Estabilidade de cultivares de milho no Estado do Piauí. *Rev Cient Rural* 2000; 5(1): 62-7.
58. Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. 2010; 21(4): 549-53.
59. Adukwu EC, Allen SC, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(5): 1217-27.
60. Millezi AF, Cardoso M, Alves E, Piccoli RH. Reduction of *Aeromonas hydrophila* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Braz J Microbiol*. 2013; 44(1): 73-80.
61. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004; 30(4): 218-9.
62. Ercan E, Dalli M, Dulgergil 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): e27-31.
63. Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, de Martin AS, Gomes BP, Motta RH, et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *Eur J Dent*. 2011; 5(1): 1-7.
64. Sienkiewicz M, Lysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb Drug Resist*. 2012; 18(2): 137-48.
65. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol*. 2013; 145(3): 686-98.
66. Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine*. 2015; 22(6): 657-65.
67. Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J Appl Microbiol*. 2010; 109(4): 1139-49.
68. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.
69. Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio M, Lopez ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci*. 2004; 46(2): 107-11.
70. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol*. 2012; 28(4): 320-3.
71. Rivas L, McDonnell MJ, Burgess CM, O'Brien M, Navarro-Villa A, Fanning S, et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol*. 2010; 139(1-2): 70-8.

72. Abbaszadegan A, Sahebi S, Gholami A, Delroba A, Kiani A, Iraj A, et al. Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*. *J Investig Clin Dent*. 2016; 7(1): 93-101.
73. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999; 86(6): 985-90.

APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 1

Determinação do pH em tubos de polietileno

Tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno foram preenchidos com as medicações (Figura A1) com auxílio de seringa plástica de 3 mL e agulha 1,2 x 40 (Benton, Dickinson and Company, Juiz de Fora, MG, Brasil). Os tubos foram submersos em frascos plásticos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Os frascos foram mantidos em estufa à 37 °C. Após 12 horas de imersão, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça clínica. A solução resultante de cada um dos frascos utilizados foi utilizada para realizar a aferição do pH. Este procedimento foi repetido pelos períodos de 12 h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

O pH das soluções foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente (25°C). Previamente à aferição do pH, o dispositivo foi calibrado com soluções-tampão de pH 4, 7 e 10 e estas foram utilizadas para averiguar a calibragem do pHmetro durante todo o período experimental.

Figura A1- Tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro preenchidos com medicação intracanal



Autores:
Profa. Dra. Roberta Bosso Martelo
Profa. Dra. Raqueli Viapiana

Avaliação ex vivo da atividade antibacteriana

Foram utilizados 72 incisivos inferiores unirradiculares com dimensões e anatomia radiculares semelhantes. Os dentes foram radiografados nos sentidos vestibulo-lingual e méso-distal e a superfície externa foi observada em microscópio óptico para detectar trincas e/ou fraturas. Foram incluídos dentes com anatomia similar sem trincas nem fraturas

radiculares. As coroas dentais foram seccionadas em máquina de precisão Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL. EUA), padronizando o comprimento radicular em 15 mm.

A abertura foraminal foi padronizada com lima tipo K #25. Os canais radiculares foram instrumentados com o sistema rotatório MTwo (VDW, Munich, Alemanha) até o instrumento #40/.04, 1 mm aquém do comprimento real do dente. A irrigação foi realizada com 2 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% a cada troca de instrumento. Os canais radiculares foram inundados com EDTA 17% por 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução salina. Sucessivas lavagens com água destilada foram realizadas para remoção de NaOCl durante 4 dias.

A região apical foi selada com resina composta fotopolimerizável (3M ESPE, St. Paul, EUA) e a superfície radicular externa impermeabilizada com adesivo epóxi Araldite (Brascola, Joinville, SC, Brasil), exceto na região cervical (Figura A2).

Figura A2- Superfície radicular impermeabilizada com adesivo epóxi



Autor: Dra. Gisselle Moraima Chávez Andrade

Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em placas de cultura de 24 poços, fixados com resina acrílica ativada quimicamente e esterilizados em óxido de etileno (Figura A3).

Figura A3- Espécimes distribuídos em placa de 24 poços e fixados com resina acrílica



Autor: Dra. Gisselle Moraima Chávez Andrade

Os canais radiculares foram contaminados com 20 μ L de inóculo bacteriano (*E. faecalis*) e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 21 dias, em umidade relativa. A cada 2 dias, novo meio de cultura estéril (BHI), foi adicionado aos canais radiculares. Além dos grupos experimentais, o controle negativo não recebeu a suspensão bacteriana, recebendo somente o meio de cultura esterilizado, atestando, desta maneira, a eficácia da esterilização. O controle positivo não recebeu nenhuma medicação intracanal, demonstrando a viabilidade bacteriana durante o experimento.

Coleta microbiológica

As coletas microbiológicas foram realizadas com os canais radiculares inundados com solução salina estéril e introduzidos dois cones de papel absorvente estéreis (40/02), em sequência, por 1 minuto cada e inseridos em tubo Eppendorf contendo 1 mL de solução salina estéril. Após o período de contaminação (21 dias) foi realizada a coleta inicial (C1) para confirmação da contaminação por *E. faecalis*. Os canais radiculares foram reinstrumentados com lima tipo K #40 e irrigados com solução salina estéril. Os canais radiculares foram inundados com solução de EDTA 17% por 3 minutos e irrigados com 5 mL de solução salina estéril. As MICs foram inseridas com auxílio de agulha e seringa. Uma bolinha de algodão esterilizada foi adaptada nas entradas dos canais radiculares e os espécimes foram armazenados em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia, por 7 dias.

A remoção das MIC foi realizada com limas tipo K #40 e os canais irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril. Foi utilizado 1 mL de neutralizante de 0,5% de ácido cítrico para os grupos com HC e para o grupo com CLX, além do ácido cítrico, o Tween 80 + 0,07% de lecitina de soja. A irrigação final foi realizada com 1 mL de solução salina estéril e realização da coleta (C2).

Após C2, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril. Os espécimes foram incubados em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia e umidade relativa por 7 dias. Após este período realizou-se a coleta C3 para verificação de possível recolonização do canal principal.

Os tubos Eppendorf contendo os dois cones de papel absorvente foram agitados em vortex por 1 minuto. Diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas de 20 μ L de cada uma das diluições foram plaqueadas em placas de Petri, contendo *Tryptic Soy Ágar* (TSA-Difco). As placas foram incubadas em microaerofilia a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. O crescimento microbiano foi determinado pela contagem de UFC/mL⁻¹. Os dados obtidos das coletas microbiológicas foram convertidos em Log¹⁰.

APÊNDICE B – METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 2

Difusão de íons hidroxila em dentina bovina

Foram utilizados 72 dentes de bovinos. As coroas dentárias foram seccionadas em máquina de corte Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL. EUA) e comprimento das raízes padronizado em 15 mm (Figura B1).

Figura B1- Comprimento das raízes padronizados em 15 mm



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Os espécimes serão submersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 48 horas e enxaguados em água destilada por 4 dias. Os canais radiculares foram instrumentados 1 mm aquém do comprimento do dente até a lima K #110 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). A irrigação foi realizada com solução de NaOCl a 2,5% (Instituto de Química, Araraquara, UNESP – Brasil) durante todo o preparo biomecânico. Foram utilizados 5 mL no início e ao final da instrumentação e 2 mL a cada troca de limas. Gates-Glidden número 5 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizada até o comprimento de 11 mm. Solução de EDTA 17% (Odahcam Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) foi utilizada por 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução salina.

Cavidade com 4 mm x 2 mm x 0,5 mm (comprimento x largura x profundidade) foi confeccionada na superfície radicular proximal, entre 5 mm e 9 mm do ápice radicular com broca diamantada 1052 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) para padronização da espessura dentinária remanescente (Figura B2). Os espécimes foram mensurados e radiografados para garantir espessura uniforme de dentina entre a parede de fundo da cavidade e a parede interna do canal radicular.

Figura B2- Confeção da cavidade na superfície radicular



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A superfície radicular externa foi impermeabilizada com adesivo epóxi Araldite (Brascola, Joinville, SC, Brasil) complementado por uma camada de esmalte para unhas (Colorama, São Paulo, SP, Brasil), exceto na área da cavidade confeccionada. Apenas os dentes do grupo controle negativo foram completamente impermeabilizados, incluindo a área da cavidade radicular.

Após a colocação das MIC, a abertura do canal radicular foi selada com resina composta fotopolimerizável e impermeabilizada. Após a secagem, as amostras foram imersas em frascos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Estes frascos foram armazenados em estufa a 37°C e o pH da solução avaliado nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28 dias por meio de pHmetro digital Digimed DM-22 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) calibrado com pH 4, 7 e 10 à temperatura ambiente (25°C).

Teste de contato direto sobre biofilme

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil) sob condições assépticas. Foram obtidas culturas puras de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) por meio de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo TSa (Tryptic Soy Agar, Difco, Detroit, MI, EUA) 18 horas antes de cada teste. A pureza das culturas foi confirmada por meio de morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram). A concentração do inóculo bacteriano foi ajustada por meio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) e uma concentração equivalente a 10^8 UFC mL⁻¹.

Foram confeccionados blocos de dentina a partir de dentes de bovinos com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (comprimento x largura x espessura) usando máquina de corte de

precisão Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Os blocos de dentina permaneceram em EDTA 17% por 3 minutos e enxaguados abundantemente com solução salina. Em seguida, esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os blocos de dentina foram distribuídos em placas de cultura celular de 24 poços. Cada poço recebeu 200 µL de inóculo bacteriano de *E. faecalis*. Após os inóculos foi adicionado 1,8 mL de meio de cultura estéril BHI e foram mantidos em incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), em microaerofilia, a 37°C por 15 dias. A cada 48 horas o meio foi renovado, sem adição de novos micro-organismos.

Os blocos de dentina foram lavados duas vezes em salina a 0,85% para remoção das células não aderidas. Em placas de 48 poços foram colocadas 1 mL da suspensão das medicações intracanal na concentração de 25mg/mL e os blocos permaneceram em contato durante 24 horas, em estufa a 37°C. No grupo controle negativo foi utilizado água destilada com a finalidade de verificar a viabilidade do biofilme durante o período de incubação. Para cada grupo avaliado foi utilizado 6 blocos de dentina.

Após os períodos de contato, os blocos contendo o biofilme remanescente foram lavados em solução salina estéril e, individualmente, armazenados em tubos eppendorf contendo 1 mL das soluções neutralizantes (Tabela B1) e pérolas de vidro ($3,50 \pm 0,2$). Os tubos foram agitados em vortex (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 minuto a fim de promover o rompimento do biofilme aderido ao bloco de dentina.

Tabela B1- Neutralizantes utilizados para cada MIC

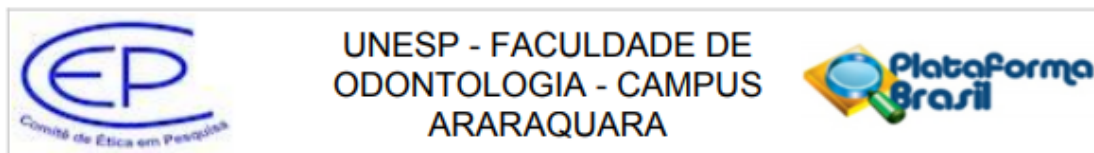
MICs	Neutralizador
HC	0,5% de ácido cítrico
HC-LE	0,5% de ácido cítrico
HC-TH	0,5% de ácido cítrico
HC-PMCC	0,5% de ácido cítrico
HC-CLX	0,5% de ácido cítrico/Tween 80 + 0,07% de leticinina de soja

Fonte: Autor.

Foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-4} utilizando, nos dois primeiros tubos, os agentes neutralizantes descritos anteriormente. Aliquotas de 20 µL de cada diluição da suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h para posterior contagem de UFC mL⁻¹.

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP)

CAAE: 77793417.4.0000.5416

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação do pH e atividade antibacteriana de pastas à base de hidróxido de cálcio associados a óleos essenciais

Pesquisador: Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Versão: 1

CAAE: 77793417.4.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 114922/2017

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL

Informamos que o projeto Avaliação do pH e atividade antibacteriana de pastas à base de hidróxido de cálcio associados a óleos essenciais que tem como pesquisador responsável Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, foi recebido para análise ética no CEP UNESP - Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara em 28/09/2017 às 15:45.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação do pH e atividade antibacteriana de pastas à base de hidróxido de cálcio associados a óleos essenciais

Pesquisador: Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77793417.4.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.385.612

Apresentação do Projeto:

Medições intracanal à base de hidróxido de cálcio (HC) são muito utilizadas em Endodontia devido as suas propriedades biológicas e antimicrobianas. No entanto, a eliminação de micro-organismos resistentes ainda é um desafio na terapia endodôntica. Os óleos essenciais têm sido estudados por apresentarem excelente ação antimicrobiana sem gerar resistência microbiana. O objetivo do presente estudo experimental in vitro, que utilizará 74 dentes unirradiculares e padronizados, pré-selecionados através de radiografia digital, será avaliar pH e atividade antimicrobiana de dois tipos de óleos essenciais, sendo eles Lemongrass e Thyme Oil, em comparação com outras mediações intracanal e associações já utilizadas (Calen®, Calen PMCC® e Calen® + Clorexidina). Será realizada avaliação do pH em tubos de polietileno nos períodos de 12h, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Posteriormente, será realizado teste ex vivo em dentes humanos (extraídos) contaminados por 21 dias com *Enterococcus faecalis*. Serão utilizados 74 dentes humanos extraídos, com canal único e reto, as coroas serão removidas e as raízes padronizadas em 15 mm de comprimento. Em seguida, os canais radiculares serão instrumentados com sistema rotatório Mtwo até lima #40/.04 e a superfície externa das raízes serão impermeabilizadas. Serão realizadas 3 coletas microbiológicas [inicial (C1), pós-medicação (C2) e final (C3)]. A C1 será realizada após período de contaminação; C2, após 7 dias da medicação intracanal (MIC) do dente extraído; e C3, após 7 dias da remoção da MIC. Após plaqueamento será realizada contagem de UFC mL⁻¹. Os dados serão analisados estatisticamente por meio dos testes apropriados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1002689.pdf	11/11/2017 17:09:36		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto3.pdf	11/11/2017 17:09:01	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	pesquisador_declaracao_aceite_Lab_bioma3.pdf	11/11/2017 16:54:13	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	pesquisador_declaracao_aceite_Lab_Micro3.pdf	11/11/2017 16:52:53	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Orçamento	Orcamento_e_detalhamento_de_despesas.pdf	30/10/2017 11:36:42	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Ausn_TCLE.pdf	30/10/2017 10:17:25	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Patricia.pdf	30/10/2017 10:13:48	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_Execucao.pdf	30/10/2017 10:13:14	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_bdentes.pdf	26/09/2017 11:01:43	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	termo_de_compromisso.pdf	26/09/2017 10:31:05	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	devolucao_mat_biologico.pdf	26/09/2017 10:30:39	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	declaracao_ressarcimento.pdf	26/09/2017 10:28:03	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANEXO B- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Número de protocolo: 35/2017



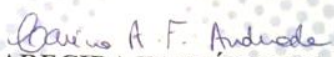
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"DESENVOLVIMENTO DE PASTAS À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADOS A ÓLEOS ESSENCIAIS: AVALIAÇÃO DO PH E ATIVIDADE ANTIBIOFILME"***, registrada com o nº 35/2017, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Juliane Maria Guerreiro Tanomaru** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 28/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Abril/2018
Espécie/linhagem	Gado Nelore
Nº de animais	118 dentes bovinos
Peso/Idade	250 kg/ 5 anos
Sexo	-
Origem	Mondelli Indústria de Alimentos S/A.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 28 março de 2020.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2018.

Patrícia Conde Vital