

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**



Dissertação de Mestrado

**Eficácia antimicrobiana de óleos essenciais *Tea Tree (Malaleuca Alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* como material endodôntico: Uma revisão de literatura e um estudo *in vitro* contra biofilme múltiplo**

Helhen Cristina da Luz Cardoso

Brasília, 01 de junho de 2024

**Helhen Cristina da Luz Cardoso**

**Eficácia antimicrobiana de óleos essenciais *Tea Tree (Malaleuca Alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* como material endodôntico: Uma revisão de literatura e um estudo *in vitro* contra biofilme múltiplo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles

Brasília, 2024

**Helhen Cristina da Luz Cardoso**

**Eficácia antimicrobiana de óleos essenciais *Tea Tree (Malaleuca Alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* como material endodôntico: Uma revisão de literatura e um estudo *in vitro* contra biofilme múltiplo**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da Defesa: 06 de junho de 2024

Banca Examinadora:

---

Prof. Dra. Loise Pedrosa Salles (Orientadora)

---

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira

---

Prof. Dra. Letícia Diniz Santos Vieira

---

Prof. Dra. Nailê Damé-Teixeira (suplente)

*Dedico este trabalho à minha família, de casa e de coração: meus pais e minha irmã, por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem em todas as minhas decisões, por mais desafiadoras que elas sejam.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois Ele que tudo sabe, mesmo sem eu entender, me colocou no caminho certo e meu deus forças para seguir.

Agradeço aos meus pais, Josefa e Waldeir, por acreditarem em mim e me apoiarem, e por me darem suporte físico e emocional nos momentos que mais precisei.

Agradeço à minha irmã, Danúbia Cristina, pela cumplicidade e companheirismo durante toda a jornada.

Agradeço à minha irmã de coração, Manuela Aguiar, pelo tempo que convivemos e por me apoiar nesta nova etapa.

Agradeço a minhas velhas amigas, Mônica Umpierre, Rayanne Lisboa, Mayra Roquete, Karen Ariely e Danielly Mendonça, que me apoiaram desde o início, e acreditaram em mim mesmo antes de tudo acontecer.

Agradeço aos novos amigos que fiz durante esta caminhada, vocês tornaram a caminhada mais leve, em especial Letícia Delfino, Luíza Damasceno, Joana Rodrigues e Raquel Cardoso, vocês foram essenciais, obrigada pela cumplicidade compartilhada.

Agradeço, ao técnico Rafael Brasil, tanto pelo seu apoio e seus ensinamentos no laboratório de microbiologia, quanto pelo seu carisma e seu jeito acolhedor de ser, sempre tendo cuidado e responsabilidade com nosso trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia, em especial ao Prof. Dr. Fernando Araripe, por ceder estrutura e equipamentos para realização de nossos experimentos.

Agradeço ao Laboratório de Microscopia e Microanálise, em especial a ajuda e colaboração das servidoras Ingrid Silva e Melissa Monteiro.

Agradeço à minha orientadora, Loise Pedrosa, pelos conselhos, pelas palavras de afeto e por não me deixar desistir e não desistir de mim.

Agradeço à professora Sonia Bao, pela disposição em colaborar com nosso trabalho.

Por fim, agradeço a todos os professores que passaram por mim nesta jornada, foi prazer reencontrá-los e aprender um pouco mais com cada um de vocês! Obrigada.

*“Embora pareça que as coisas estejam fora de controle, nos bastidores há um Deus que não renunciou sua autoridade”*

***Autor desconhecido.***

## RESUMO

**Introdução:** O sucesso do tratamento endodôntico é dependente de múltiplos fatores que visam a eliminação da microbiota cultivável nos canais radiculares, e o uso de soluções irrigadoras é imprescindível, visto as complexidades anatômicas e a forma de organização dos microrganismos em biofilmes. **Objetivo:** O objetivo primário desta dissertação de mestrado foi avaliar o potencial antimicrobiano de soluções fitoterápicas para uso como soluções irrigadoras em endodontia. **Métodos:** Foi conduzida uma busca nas principais bases de dados, a fim de encontrar estudos que relatassem a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais citados, assim como verificar o que se sabe sobre os microrganismos colonizadores do canal do radicular, além do mais, avaliar criticamente os irrigantes utilizados atualmente durante a terapia endodôntica, idealizando por fim, uma revisão de literatura narrativa. Ademais, um estudo *in vitro* foi realizado, comparando a ação antimicrobiana da associação dos óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* com hipoclorito de sódio 2,5% e solução de digluconato de clorexidina 2% como soluções irrigadoras em biofilme multiespécie. Foi avaliada a viabilidade dos microrganismos através dos experimentos de MTT e LIVE/DEAD com posterior visualização em microscopia confocal e de varredura (MEV). **Resultados:** teste ANOVA revelou diferença estatística significativa em ensaio MTT, entre a média da quantidade de microrganismos viáveis após a exposição aos irrigantes testados ( $p = 0,000$ ,  $F = 330,8$ ), assim como na viabilidade avaliada em teste LIVE/DEAD ( $p = 0,000$ ,  $F = 248,38$ ). A microscopia de varredura mostrou maior redução do biofilme após exposição à NaOCl 2,5%, seguido de solução fitoterápica e CHX 2%. **Conclusão:** Os óleos essenciais se mostraram eficazes contra os microrganismos organizados em biofilme múltiplo, superior a clorexidina 2%, porém, com ação antimicrobiana inferior ao NaOCl 2,5%. A busca por novas soluções irrigadoras ainda é essencial no campo da endodontia, uma vez que ainda não há no meio clínico nenhum irrigante do canal radicular que proporcione conjuntamente todas as características ideais desejadas.

**Palavras-chave:** Tratamento do Canal Radicular, Endodontia, Óleo de Melaleuca, Citrus, Hipoclorito de Sódio, Clorexidina.

## ABSTRACT

**Introduction:** The success of endodontic treatment depends on multiple factors that aim to eliminate cultivable microbiota in root canals, and the use of irrigating solutions is essential, given the anatomical complexities and the way microorganisms are organized in biofilms. **Objective:** The primary objective of this master's dissertation was to evaluate the antimicrobial potential of herbal solutions for use as irrigating solutions in endodontics. **Methods:** A search was carried out in the main databases in order to find studies that reported the antimicrobial efficacy of the essential oils mentioned, as well as to verify what is known about the microorganisms that colonize the root canal, in addition to critically evaluating the irrigants currently used during endodontic therapy, finally idealizing a narrative literature review. Furthermore, an in vitro study was carried out, comparing the antimicrobial action of the association of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) and Petitgrain (*citrus aurantium*) essential oils with 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine digluconate solution as irrigating solutions in multispecies biofilm. The viability of the microorganisms was demonstrated through MTT and LIVE/DEAD experiments with subsequent visualization in confocal and scanning microscopy. **Results:** the ANOVA test revealed a statistically significant difference in the MTT assay, between the mean amount of viable microorganisms after exposure to the tested irrigants ( $p = 0.000$ ,  $F = 330.8$ ), as well as in the viability achieved in the LIVE/DEAD test ( $p = 0.000$ ,  $F = 248.38$ ). Scanning microscopy showed greater biofilm reduction after exposure to 2,5% NaOCl, followed by herbal solution and 2% CHX. **Conclusion:** Essential oils are effective against microorganisms organized in multiple biofilms, superior to 2% chlorhexidine, but with lower antimicrobial action than 2.5% NaOCl. The search for new irrigating solutions is still essential in the field of endodontics, since there is still no clinical root canal irrigating agent that provides all the desired ideal characteristics.

**Keywords:** Root Canal Treatment, Endodontics, Tea Tree Oil, Citrus, Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO 1</b>	
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	12
1.2.1 Microbiologia dos canais radiculares .....	12
1.2.2 Soluções irrigadoras no tratamento de canal radicular .....	15
1.2.2.1 Hipoclorito de sódio.....	15
1.2.2.1 Clorexidina .....	18
1.3 OBJETIVOS .....	22
1.4 REFERÊNCIAS .....	23
<b>2. CAPÍTULO 2</b>	
2.1 INTRODUÇÃO.....	32
2.2 METODOLOGIA.....	33
2.3 RESULTADOS .....	33
2.4 DISCUSSÃO.....	40
2.5 CONCLUSÕES.....	41
<b>3. CAPÍTULO 3</b>	
3.1 INTRODUÇÃO.....	48
3.2 METODOLOGIA .....	50
3.3 RESULTADOS .....	55
3.4 DISCUSSÃO.....	61
3.5 CONCLUSÕES.....	66
<b>4. CAPÍTULO 4</b>	
4.1 DISCUSSÃO GERAL .....	71
4.2 CONCLUSÕES.....	72
<b>5. CAPÍTULO Press release .....</b>	<b>73</b>

## 1 CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

A limpeza e a desinfecção dos canais radiculares são essenciais para a eficácia do tratamento endodôntico, uma vez que as bactérias exercem papel fundamental no desenvolvimento de doenças pulpares e periapicais [1, 2]. Devido a anatomia complexa do sistema de canais radiculares, essa desinfecção somente se torna possível com o uso de soluções irrigadoras auxiliares, devido a capacidade de adentrar por túbulos dentinários, istmos e canais laterais ou secundários, inacessíveis aos instrumentos durante o preparo químico-mecânico [3]. Nesse contexto, para a obtenção do sucesso do tratamento endodôntico é de suma importância o uso de soluções irrigadoras potentes com capacidade de erradicar os microrganismos patógenos presentes nos canais radiculares [2].

As soluções antimicrobianas atuam removendo e dissolvendo o biofilme de modo a reduzir a carga microbiana [4]. Dentre as características ideais de uma solução irrigadora endodôntica destaca-se a capacidade de lavagem, dissolução de tecido orgânico e inorgânico, atividade antimicrobiana, lubrificação, baixa tensão superficial, remoção de detritos, baixa toxicidade e biocompatibilidade [4-6]. Diversas soluções irrigadoras têm sido utilizadas na prática clínica, entretanto, nenhuma delas atende a todos esses requisitos conjuntamente.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução mais comumente utilizada no tratamento endodôntico, devido a sua capacidade bactericida, dissolução de tecido orgânico e baixo custo [4, 5]. Porém, é cáustico, o que o torna preocupante [1, 7]. Embora, seja o mais utilizado, e o irrigante de primeira escolha por sua ação antimicrobiana, o NaOCl é incapaz de remover detritos duros produzidos como efeitos da instrumentação, e o uso de uma solução complementar se torna necessária [5].

O ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) é uma solução quelante que possui capacidade de dissolver tecidos duros e a camada de esfregaço pós preparo químico-mecânico [8]. O EDTA é mais biocompatível que NaOCl, tem baixo custo e possui capacidade antimicrobiana, porém em pequena proporção [9, 10]. Sendo assim, seu uso como solução única no tratamento endodôntico não é recomendado [5].

A clorexidina é uma bisbiguanida catiônica que tem sido utilizada na endodontia como solução irrigadora devido seu amplo espectro antimicrobiano, sua capacidade de substantividade e sua permanência no tecido por longos períodos e baixa toxicidade [11]. No entanto, não possui capacidade de dissolução tecidual, e sua eficácia na remoção ou dissolução de biofilme é inferior à de outros irrigantes [11, 12]. Sendo assim, a CHX apresenta boas características, mas apresentam essas desvantagens consideráveis.

Na busca por soluções irrigadoras com as características desejáveis, novos irrigantes estão sendo constantemente avaliados. Algumas misturas foram desenvolvidas, baseadas na ação de um antimicrobiano, um agente quelante e um ou mais surfactantes, são exemplos dessas misturas: BioPure MTAD (Dentsply, Tulsa, OK), uma mistura do antibiótico doxiciclina, ácido cítrico e um detergente (tween 80) [13]; semelhantemente, Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Muggiò, Itália) uma mistura de doxiciclina, ácido cítrico e polipropilenoglicol [14] e QMix (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) uma solução advinda da mistura de EDTA, clorexidina e cetrimida como detergente, a fim de associar as vantagens de cada substância [15]. No entanto, as evidências disponíveis ainda são insuficientes para a prática clínica comparado ao hipoclorito de sódio [5].

Nesse contexto, o uso de soluções fitoterápicas vem ganhando destaque por suas características antimicrobianas e de biocompatibilidade [16]. Inúmeros fitoterápicos tem sido estudados para aplicação na endodontia como materiais endodônticos, são exemplos desses fitoterápicos: própolis, *thiphala*, *malaleuca alternifolia*, cúrcuma, *citrus*, *azadiarachta indica*, *morinda citrifolia*, *syzigium aromaticum*, *acácia ilótica*, *alium atium* e *zingiber officinale* [17]. As formulações a base de plantas têm se apresentado vantajosas e eficazes, promissoras no uso como materiais endodônticos [16, 18, 19].

Diante das diversas alternativas de soluções irrigadoras e as limitações ainda presentes nessas soluções, percebe-se a importância de explorar novas formulações. Visto as características promissoras das soluções fitoterápicas, este trabalho tem como objetivo a investigação sobre as soluções irrigadoras existentes e a avaliação *in vitro* de uma solução fitoterápica experimental.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Microbiologia dos Canais Radiculares

A investigação da microbiologia endodôntica se iniciou no ano de 1.894, quando W.D. Miller constatou a presença de bactérias em tecido pulpar inflamado [20]. Anos depois, Kakehashi *et. al.* observaram que microrganismos exerciam papel fundamental na cicatrização de polpas expostas [21]. Desde então, inúmeros estudos foram realizados a fim de detectar as espécies bacterianas existentes no interior dos canais radiculares e no tecido periapical subjacente, responsáveis por ocasionar os sinais e sintomas das doenças endodônticas.

As patologias pulpares e perirradiculares têm sua origem em uma comunidade diversificada de microrganismos comuns na microflora oral comensal [2]. Foi estimado que 141 táxons, representando 6 filos bacterianos diferentes povoam a cavidade oral saudável, os quais incluem: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, e TM7 [22]. Acredita-se que, assim como nas demais regiões anatômicas do corpo, a polpa dentária também seja povoada por microrganismos que estabelecem relações de simbiose, sendo considerados residentes comuns do tecido pulpar, não ocasionando efeitos patológicos aos mesmos. Nesse contexto, Widmer, *et. al.* (2018) [23], investigaram a possível presença de DNA microbiano em tecidos pulpares saudáveis, através da tecnologia molecular de sequenciamento de DNA de alto rendimento. Para tal fim, os pesquisadores selecionaram 10 dentes de pacientes livres de doença cárie ou doença periodontal, sem histórico de trauma ou tratamento prévio, com indicação de extração por motivos ortodônticos. Após um rigoroso protocolo de descontaminação, a amostra pulpar foi coletada para análise e caracterização do microbioma, e os dentes, por conseguinte, foram extraídos. Os resultados obtidos demonstraram que 100% dos tecidos pulpares amostrados continham DNA bacteriano, sendo uma média de 343 táxons por amostra. Aproximadamente 59% do total de táxons representativos pertence ao filo *Proteobacteria* dentro dos gêneros *Ralstonia*, *Acinetobacter* e *Staphylococcus*. Um “grupo central” de microrganismos apareceu em cada tecido pulpar, incluindo 12 gêneros que representam entre 50% e 84% do total de isolados pulpares, predominando novamente os gêneros *Ralstonia*, *Acinetobacter* e *Staphylococcus*,

enquanto os grupos *Burkholderia* (gênero), *Micrococcus* (gênero), *Corynebacterium* (gênero), *Micrococcaceae* (família), *Enterobacteriaceae* (família) e *Rhizobiales* (ordem), tiveram uma abundância relativa <1%. Ademais, amostras de placas supragengivais também foram sequenciadas e observou-se que 62 taxóons foram semelhantes aos encontrados no tecido pulpar. Os autores sugerem que táxons dominantes da placa dentária tendem a estar presentes em baixa abundância na polpa, e os táxons pulpares dominantes tendem a estar presentes em baixa abundância na placa [23]. Entretanto, há uma flora bacteriana presente na cavidade oral saudável distinta daquela associada à doença [22].

Nas doenças endodônticas, a infecção intrarradicular primária surge devido à invasão inicial e colonização por microrganismos do tecido pulpar necrosado [24]. Esses microrganismos iniciam o processo de inflamação, necrose e infecção pulpar e utilizam as condições ambientais do canal necrótico para se estabelecerem [6]. Foram identificadas, aproximadamente, 500 espécies diferentes de microrganismos nos diferentes tipos de infecção endodôntica (primária, secundária, persistente e extrarradicular) [24]. Sendo que os filos bacterianos mais prevalentes foram: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria* [25]. No entanto, sabe-se que os padrões bacterianos da microbiota endodôntica diferem de indivíduo para indivíduo, no qual cada ser abriga uma microbiota única em termos de riqueza e abundância de espécies, o que sugere que a periodontite apical primária tenha uma etiologia heterogênea, sendo assim não há uma única espécie que seja considerada como o principal patógeno causador, e sim a ação de múltiplas bactérias conjuntas que levam ao mesmo desfecho na doença [24].

As diversas espécies bacterianas conjuntas que dão origem à periodontite apical, e seus desdobramentos, estão organizadas em biofilme dentro do canal radicular [26]. Ricucci e Siqueira (2010) [26], realizaram biópsia de 106 raízes com periodontite apical, entre dentes com e sem tratamento endodôntico, e observaram em análise histológica e bacteriológica que 77% dos canais analisados apresentaram bactérias organizadas em biofilme na região apical do canal radicular. Quanto a estruturação desse biofilme, esta variou, tendo áreas com células bacterianas aglomeradas com pouco material extracelular visível, outras com células espaçadas em padrão irregular, em camadas mais profundas ou superficiais. Em dentes com extensas lesões de cárie e necrose pulpar de longa data foram observados biofilmes

densos recobrando a região apical. Ademais, não foi incomum a presença de biofilmes em canais laterais, istmos e em ramificações apicais [26]. A localização de biofilmes bacterianos em locais de difícil acesso facilita a permanência de microrganismos no canal radicular após o preparo químico-mecânico, corroborando para a falha do tratamento endodôntico, uma vez que tais regiões anatômicas complexas podem atuar como reservatórios de infecção residual, ocasionando a periodontite apical persistente [26-28].

As infecções secundárias, ou persistentes, são aquelas em que há persistência ou aparecimento de sinais e sintomas de infecção ativa, tais como: radiolucidez óssea na região periapical, inchaço, dor e/ou sensibilidade à percussão [28]. Ademais, são compostas por uma flora bacteriana capaz de sobreviver a condições adversas [29]. Estudos mostram que as espécies bacterianas mais prevalentes nestas infecções são: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Fusobacterium* e *Propionibacterium* [30-32]. Dentre essas, o *Enterococcus faecalis* se destaca, sendo frequentemente encontrado em dentes com periodontite apical pós-tratamento, com prevalência significativamente maior quando comparada a sua presença em infecções primárias [33].

A detecção de microrganismos nos canais radiculares, por muitas décadas, teve como padrão ouro a realização de métodos de cultura para identificação de bactérias e fungos, entretanto, sabe-se, atualmente, que apenas cerca de metade das bactérias orais são cultiváveis [2]. Além do mais, a coleta de amostras do ambiente endodôntico para a realização do cultivo é desafiadora e imprecisa, uma vez que em grande parte das situações são utilizadas pontas de papel, as quais conseguem capturar principalmente bactérias planctônicas distribuídas ao longo do canal principal, não sendo possível distinguir segmentos e realizar a seletividade de microrganismos apenas de uma região de interesse, como no terço apical [2, 30]. Atualmente, métodos moleculares tiveram significativos avanços e estão entre os mais precisos para detecção, identificação e quantificação de microrganismos. Dentre os métodos atuais disponíveis estão a amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR), seguido pela clonagem e sequenciamento do gene 16S e o sequenciamento de próxima geração, na qual se encontra o pirosequenciamento, que realiza um grande número de leituras em uma única execução, resultando em uma profundidade de amostragem maior e permitindo a detecção de táxons de baixa

abundância [2, 34]. O avanço nas técnicas moleculares é de suma importância no contexto de investigação da microbiota endodôntica, uma vez que possibilita a identificação de padrões microbianos específicos relacionados com saúde e doença, resultando em diagnósticos mais precisos e medidas preventivas e terapêuticas mais eficazes [34].

### **1.2.2 Soluções Irrigadoras no Tratamento de Canal Radicular**

O uso de soluções irrigadoras é essencial no decorrer do tratamento endodôntico, uma vez que é a única maneira de realizar a desinfecção de áreas não tocadas por instrumentos nas paredes do canal radicular [4]. Somado a isto, o processo de irrigação é extremamente importante para impedir o acúmulo de detritos de dentina no ápice do conduto, e a extrusão de microrganismos para os tecidos periapicais [35]. Acredita-se que esses detritos acumulados podem atuar como isolamento protetor para o biofilme subjacente [36, 37]. Os microrganismos que permanecem viáveis após a instrumentação mecânica e à ação química dos irrigantes são os principais causadores de falhas pós o tratamento endodôntico primário, ou retratamento não cirúrgico [37, 38]. Sendo assim, é essencial que as soluções irrigadoras cumpram quesitos básicos a fim de garantir a eficácia do tratamento.

As características ideais das soluções irrigadoras incluem ação antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos; inativação de fatores de virulência; desintegração de biofilme; dissolução de tecido pulpar; remoção de detritos duros acumulados; ausência de efeitos adversos locais e sistêmicos; ausência de toxicidade, biocompatibilidade, ampla disponibilidade a baixo custo, e capacidade de fluir para estruturas inacessíveis sem enfraquecer a estrutura dentária [5, 39]. No entanto, não há atualmente uma solução irrigadora que disponha simultaneamente, de todas estas características ideais em conjunto.

#### **1.2.2.1 Hipoclorito de Sódio**

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é atualmente o irrigante mais utilizado no tratamento de canal radicular, sendo considerado o padrão ouro dentre as soluções irrigadoras disponíveis [5, 40]. Sua ampla utilização se deve, em grande parte, pela

eficaz ação antimicrobiana, e por possuir uma capacidade única de dissolução de tecido pulpar [41]. Tais ações são de suma importância, visto que a permanência de tecido pulpar remanescente pode fornecer condições ideais para sobrevivência e proliferação de microrganismos [7]. Sendo assim, devido ao seu mecanismo de ação, é largamente utilizado durante o preparo químico mecânico.

Os efeitos químicos produzidos pelo NaOCl se dão pelo cloro livre disponível, que se apresenta na forma de ácido hipocloroso (HOCl-) e íons hipoclorito (OCl-). Estas moléculas levam à degradação e hidrólise de aminoácidos quando em contato com o grupo amino de proteínas. O ácido hipocloroso ao entrar em contato com o tecido orgânico age como solvente, liberando cloro. A reação entre o cloro e o grupo amino interfere no metabolismo celular. Além disso, o cloro tem ação antimicrobiana ao inibir enzimas bacterianas, causando uma oxidação irreversível dos grupos sulfidril de enzimas essenciais [41]. Outro fato relevante nas propriedades do hipoclorito de sódio é que o pH básico, encontrado em NaOCl de 2% a 5% [42], altera a integridade da membrana citoplasmáticas das células bacterianas, ocasionando lesões químicas em componentes orgânicos e afetando o transporte de nutrientes, por meio da degradação de fosfolípidios e ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática [40, 41].

O hipoclorito de sódio é encontrado para uso na endodontia em diversas concentrações, não existindo ainda um consenso de concentração ideal para uso durante o tratamento endodôntico. Entretanto, observa-se que a capacidade de dissolução do NaOCl é dependente de concentração e tempo de contato [43, 44]. Zhejun Wang, *et al.* (2020), em um estudo *in vitro*, perceberam que NaOCl 2% dissolveu menor quantidade de biofilme, quando comparado à NaOCl 6%, durante o mesmo período de 32 minutos [43]. Siqueira JF Jr, *et al.* (2000), comparou, através de métodos de cultura, a redução bacteriana intracanal *in vitro* de *Enterococcus faecalis* após instrumentação e irrigação com soluções de NaOCl à 1%, 2,5% e 5,25% e obteve uma quantidade de redução de acordo com a concentração decrescente das soluções, porém sem diferença estatística significativa entre elas [45]. Anos depois, Forough Reyhani M, *et al.* (2017), avaliando o efeito antimicrobiano do NaOCl também em concentrações de 1%, 2,5% e 5,25% em biofilmes de diferentes idades, formado apenas por *Enterococcus faecalis*, observou, através de microscopia eletrônica de varredura, que havia presença de bactérias nos canais expostos após a

irrigação com NaOCl 1%, enquanto nenhuma bactéria foi encontrada nos grupos de concentração 2,5% e 5,25%, em mesmas condições ambientais [46].

Além da concentração, outro fator que pode afetar a ação antimicrobiana e a capacidade de dissolução tecidual é a temperatura de uso da solução e a presença ou não de agitação. Stojicic *et al.* (2010) em um estudo *in vitro*, avaliaram a capacidade de dissolução de tecido bovino com a utilização de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações: 1%, 2%, 4% e 5,8%, em temperatura ambiente, e aquecidos à 37 °C e à 45 °C, com e sem agitação sônica, ultrassônica e por pipetagem. Após a exposição às soluções, a dissolução tecidual, medida pela perda de peso, foi maior de acordo com as maiores concentrações e maiores temperaturas. A agitação proporcionou a dissolução mais rápida do tecido. Além do mais, a perda de peso tecidual foi significativamente maior em ambas as temperaturas testadas quando utilizadas em conjunto com algum método de agitação [44].

A dissolução tecidual impacta não apenas o tecido pulpar, como também o tecido dentinário das paredes do canal radicular, devido aos seus componentes de natureza orgânica, o alterando de maneira irreversível, ocasionando alterações físicas e mecânicas negativas à estrutura dentária, como formação de microfissuras e diminuição da resistência à flexão e do módulo de elasticidade [47, 48]. Um estudo *in vitro* avaliando a microdureza da dentina após a irrigação com NaOCl 2,5% e NaOCl 6%, por períodos de 5, 10 e 20 minutos mostrou que o NaOCl em ambas as concentrações diminuiu a microdureza dentinária em todos os períodos, não obtendo diferença significativa apenas entre o grupo controle e NaOCl 2,5% após 5 minutos. Ademais, NaOCl a 6% diminuiu a microdureza de forma mais acentuada a uma distância de até 1500µm do lúmen do canal.

Um efeito indesejado, considerado uma das principais complicações do tratamento endodôntico, possíveis de acontecer após o uso de hipoclorito de sódio, é a dor pós-operatória. Tal fato pode ter diversas origens, nos quais a extrusão da solução pode ser uma das principais, uma vez que o NaOCl é considerado citotóxico aos tecidos periapicais, e pode desencadear uma reação inflamatória, principalmente, 24 horas após o tratamento [40, 49]. Um estudo visando avaliar clinicamente a presença e a intensidade de dor de acordo com a concentração, mostrou que não houve diferença estatística em relação a estes parâmetros quando comparados a NaOCl nas seguintes concentrações: 2,5%, 5,25% e 8,25%, entretanto, a maior taxa

percentual de dor pós-operatória foi de NaOCl 5,25%, seguido de NaOCl 8,25% [50]. Uma maneira proposta recentemente para evitar a extrusão apical, e conseqüentemente, redução dos sintomas pós-operatórias do NaOCl é a utilização de sua formulação em gel. Entretanto, caso a extrusão ocorra, é necessário verificar os sinais e sintomas que o paciente apresenta a fim de definir a gravidade das lesões teciduais.

Em lesões leves, após a extrusão, o paciente pode apresentar dor de baixo grau, equimoses localizadas e inchaço. Tais efeitos podem ser tratados imediatamente com aspiração do NaOCl do canal radicular, irrigação com solução salina; anestesia local para alívio da dor, inserção de hidróxido de cálcio como medicamento intracanal e selamento da cavidade [51]. Posteriormente, recomenda-se prescrever analgésicos e anti-inflamatórios alternados; descongestionante nasal, caso o seio maxilar esteja envolvido, e possivelmente antibióticos para prevenir infecções secundárias [51]. Além disso, é essencial orientar o paciente sobre o uso de compressas frias nas primeiras 24 horas e realizar radiografia periapical para acompanhamento. Em caso de lesões graves, caracterizada por dor intensa prolongada, inchaço difuso, ulceração ou necrose da mucosa, e/ou déficits neurológicos, é fundamental encaminhar para unidade hospitalar. Caso haja comprometimento das vias aéreas com dificuldade respiratória, é imprescindível o atendimento de emergência [51].

### **1.2.2.2 Clorexidina**

A clorexidina (CHX) é uma molécula simétrica de bis-biguanida, que possui duas cadeias de cloroguanida conectadas por uma cadeia central de hexametileno e carrega duas cargas positivas em pH fisiológico [52]. A CHX pode atuar como agente antimicrobiano em diversas fases do preparo do canal radicular, tais como: desinfecção do campo operatório, solução irrigadora durante o preparo químico-mecânico, medicação intracanal, e desinfecção de cones para obturação [53]. Se apresenta como solução líquida ou gel, e é largamente utilizada como antisséptico devido à sua eficácia de amplo espectro, e por possuir substantividade e baixa irritação [54].

O mecanismo de ação bactericida da clorexidina se dá pela interação da substância com a membrana celular bacteriana [11, 54]. Em concentrações altas (2%), a ligação eletrostática de suas moléculas catiônicas com a parede celular bacteriana de carga negativa ocasiona ruptura da mesma, posterior precipitação e coagulação de proteínas citoplasmáticas, e conseqüentemente, morte celular [11]. Em concentrações baixas (0,2%), tem um efeito bacteriostático, por causar apenas alteração da integridade da membrana celular e vazamento dos componentes bacterianos [11]. A CHX é bem aceita na odontologia por seu bom efeito antimicrobiano, em especial, em relação ao *Enterococcus faecalis*.

Alguns estudos concluíram que o digluconato de clorexidina é tão eficaz quanto o hipoclorito de sódio na redução da infecção bacteriana. Vianna, M. E., *et. al.* (2004) avaliou a ação antimicrobiana do gel e da solução líquida de clorexidina nas concentrações de 0,2%, 1% e 2%, comparando com hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25% e constatou que a clorexidina, líquida, em todas as concentrações, e gel 2%, eliminou todos os microrganismos em até 1 minuto, enquanto apenas o NaOCl 5,25% eliminou todos os microrganismos em menos de 1 minuto, as demais concentrações levaram tempo superior a 5 minutos para matar todos os microrganismos avaliados. No entanto, concluíram que ambos os produtos, clorexidina e NaOCl, são antimicrobianos eficazes que podem ser utilizados como irrigantes no tratamento endodôntico [55]. Ruksakiet K, *et. al.* (2020) em uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados avaliaram estudos que compararam o efeito dos irrigantes CHX e NaOCl, tendo como desfecho a redução bacteriana avaliada por métodos de cultura ou métodos moleculares, e concluíram que ambos apresentam eficácia semelhante, através de mecanismos de ações diferentes [56]. Entretanto, há controvérsias quanto ao seu uso como irrigante único no tratamento endodôntico, uma vez que não possui capacidade de dissolução de matéria orgânica ou inorgânica [4, 54].

Estudos avaliando a ação da clorexidina em biofilmes, observaram que há uma menor desintegração do biofilme quando utilizada a CHX, comparado ao NaOCl [57, 58]. Del Carpio-Perochena A, *et. al.*, (2014) avaliou a espessura de biofilme orais, cultivados em bloco de dentina bovina e mantidos em aparelho ortodôntico intraoral, após o tratamento *in vitro* com NaOCl em diferentes concentrações e CHX 2%, e percebeu que o biofilme tratado com clorexidina não obteve efeito em sua espessura,

não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos de CHX 2% e as amostras pré-irrigação, considerado grupo controle [58]. Demais pesquisadores, com o objetivo de avaliar a arquitetura do biofilme após o uso de irrigantes, cultivou, conjuntamente, *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii* em amostras de biofilmes de hidroxiapatita e os expôs às soluções de NaOCl 2%, clorexidina 2% (CHX), e ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 17%, por 60 segundos. Em seguida avaliou a remoção do biofilme com tomografia de coerência óptica, realizou teste de compressão de baixa carga, e visualização em microscopia confocal de varredura a laser. Como resultado, observou que a CHX foi ineficaz, causando um rearranjo na estrutura do biofilme ao invés de remoção, enquanto NaOCl demonstrou maior eficácia na remoção de biofilme, comparado aos demais irrigantes [57].

Uma propriedade peculiar do digluconato de clorexidina é a substantividade. A substância liga-se à hidroxiapatita do esmalte e da dentina e é liberado lentamente, proporcionando um efeito antimicrobiano prolongado [11]. Mahendra *et al.* (2014) compararam a substantividade antimicrobiana de soluções de CHX nas concentrações de 0,1%, 1% e 2%, através da instrumentação do canal radicular juntamente com irrigação de CHX nas concentrações teste. Com auxílio de pontas de papel coletou amostras em intervalos de 12 horas, 1 dia, 2 dias e 3 dias, e em seguida realizou ensaio microbiológico em placas de ágar, com *Streptococcus mutans*, verificando a ação antimicrobiana após os sobrepor as pontas de papel nas placas ágar e medir as zonas inibitórias. Ao fim do experimento, concluiu que a substantividade antibacteriana foi maior de acordo com a maior concentração de clorexidina, assim sendo, CHX 2%, seguida de CHX 1% e 0,1% [59]. Entretanto, mais estudos em relação sobre o tempo de permanência da clorexidina no canal radicular após a irrigação são necessários para verificar os efeitos clínicos desta propriedade [5].

O uso da clorexidina requer cautela no decorrer do tratamento endodôntico se associado ao uso de hipoclorito de sódio [5]. É crucial evitar tal combinação, pois essa mistura pode resultar na formação de um precipitado de coloração marrom-alaranjada, potencialmente tóxico, semelhante à para-cloroanilina, reconhecida por seu potencial cancerígeno e genotóxico [60]. Esse produto também pode causar descoloração dentária, e interferir na obturação do canal radicular [5, 7]. Tentativas com protocolos de irrigação modificados, utilizando EDTA 17%, água deionizada, e tiosulfato de

sódio a 5%, como irrigantes intermediários, para prevenir a formação do precipitado, foram investigadas [61]. O tiosulfato de sódio foi o mais eficaz, mas ainda não há um consenso claro sobre um protocolo que elimine completamente tal situação [61]. Métodos como o uso de metanol e ácido acético a 1 mol/L foram testados para dissolver o precipitado formado após a reação entre o hipoclorito de sódio e a clorexidina; entretanto, o metanol não é adequado para uso *in vivo*, e o ácido acético dissolve o precipitado, embora mantenha a coloração marrom [62]. Portanto, é mais recomendável evitar a formação do precipitado do que tentar dissolvê-lo após sua formação.

### 1.3 OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o potencial antimicrobiano de soluções fitoterápicas para uso como soluções irrigadoras em endodontia.

#### 1.3.1 Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento de estudos publicados que contenham dados acerca do potencial de extrato de plantas na composição de soluções irrigadoras;
- Avaliar os irrigantes utilizados durante a terapia endodôntica;
- Avaliar *in vitro* a eficácia antimicrobiana de uma solução irrigadora endodôntica experimental.

## 1.4 REFERÊNCIAS

1. Ørstavik, D., V. Qvist, and K. Stoltze, *A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(3): p. 224-30.
2. Fouad, A.F., *Endodontic Microbiology and Pathobiology: Current State of Knowledge*. Dent Clin North Am, 2017. **61**(1): p. 1-15.
3. Peters, O.A., *Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review*. J Endod, 2004. **30**(8): p. 559-67.
4. Haapasalo, M., et al., *Irrigation in endodontics*. Br Dent J, 2014. **216**(6): p. 299-303.
5. Boutsoukis, C. and M.T. Arias-Moliz, *Present status and future directions - irrigants and irrigation methods*. Int Endod J, 2022. **55 Suppl 3**(Suppl 3): p. 588-612.
6. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections*. Int Endod J, 2022. **55 Suppl 3**: p. 512-530.
7. Zehnder, M., *Root canal irrigants*. J Endod, 2006. **32**(5): p. 389-98.
8. Calt, S. and A. Serper, *Time-dependent effects of EDTA on dentin structures*. J Endod, 2002. **28**(1): p. 17-9.
9. Arias-Moliz, M.T., et al., *Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **106**(2): p. e84-9.
10. Ordinola-Zapata, R., et al., *Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model*. Int Endod J, 2012. **45**(2): p. 162-8.
11. Bernardi, A. and C.S. Teixeira, *The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics*. Quintessence Int, 2015. **46**(7): p. 575-82.

12. Dagna, A., et al., *In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of endodontic irrigants*. Int J Artif Organs, 2011. **34**(9): p. 914-9.
13. Torabinejad, M., et al., *A new solution for the removal of the smear layer*. J Endod, 2003. **29**(3): p. 170-5.
14. Mohammadi, Z., et al., *Effect of irrigation with Tetraclean on bacterial leakage of obturated root canals*. N Y State Dent J, 2014. **80**(3): p. 39-43.
15. Stojicic, S., et al., *Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX*. Int Endod J, 2012. **45**(4): p. 363-71.
16. Almadi, E.M. and A.A. Almohaimede, *Natural products in endodontics*. Saudi Med J, 2018. **39**(2): p. 124-130.
17. S, A., et al., *Herbendodontics – Phytotherapy In Endodontics: A Review*. Biomedical and Pharmacology Journal, 2018. **11**: p. 1073-1082.
18. Karobari, M.I., et al., *Herbal Medications in Endodontics and Its Application-A Review of Literature*. Materials (Basel), 2022. **15**(9).
19. Parle, M. and N. Bansap, *Herbal Medicines: Are they safe?* Nat. Prod. Radiance, 2006. **5**.
20. Miller, W.D., *An Introduction to the Study of the Bacterio-pathology of the Dental Pulp*. 1894.
21. Kakehashi, S., H.R. Stanley, and R.J. Fitzgerald, *THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1965. **20**: p. 340-9.
22. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5721-32.

23. Widmer, C., et al., *Culture-independent Characterization of the Microbiome of Healthy Pulp*. J Endod, 2018. **44**(7): p. 1132-1139.e2.
24. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Diversity of endodontic microbiota revisited*. J Dent Res, 2009. **88**(11): p. 969-81.
25. Shin, J.M., et al., *Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing*. J Endod, 2018. **44**(7): p. 1080-1087.
26. Ricucci, D. and J.F. Siqueira, Jr., *Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings*. J Endod, 2010. **36**(8): p. 1277-88.
27. Haapasalo, M., T. Udnæs, and U. Endal, *Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment*. Endodontic topics, 2003. **6**(1): p. 29-56.
28. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures*. J Endod, 2008. **34**(11): p. 1291-1301.e3.
29. Neelakantan, P., et al., *Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(8).
30. Siqueira, J.F., Jr., et al., *The Apical Root Canal System of Teeth with Posttreatment Apical Periodontitis: Correlating Microbiologic, Tomographic, and Histopathologic Findings*. J Endod, 2020. **46**(9): p. 1195-1203.
31. Wang, J., et al., *Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis*. J Endod, 2012. **38**(7): p. 954-9.
32. Prada, I., et al., *Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2019. **24**(3): p. e364-e372.

33. Sedgley, C., et al., *Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root canals*. J Endod, 2006. **32**(3): p. 173-7.
34. Siqueira, J.F., Jr., A.F. Fouad, and I.N. Rôças, *Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes*. J Oral Microbiol, 2012. **4**.
35. Park, E., Y. Shen, and M. Haapasalo, *Irrigation of the apical root canal*. Endodontic Topics, 2012. **27**(1): p. 54-73.
36. Paqué, F., et al., *Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans*. J Endod, 2009. **35**(7): p. 1044-7.
37. Paqué, F., C. Boessler, and M. Zehnder, *Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps*. Int Endod J, 2011. **44**(2): p. 148-53.
38. Gorni, F.G. and M.M. Gagliani, *The outcome of endodontic retreatment: a 2-yr follow-up*. J Endod, 2004. **30**(1): p. 1-4.
39. Mahant, R., *A Contemporary Overview of Endodontic Irrigants – A Review*. austin journal of dental applications, 2014. **1**: p. 105-115.
40. Cai, C., et al., *Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment*. Biomed Res Int, 2023. **2023**: p. 8858283.
41. Estrela, C., et al., *Mechanism of action of sodium hypochlorite*. Braz Dent J, 2002. **13**(2): p. 113-7.
42. van der Waal, S.V., N.E. van Dusseldorp, and J.J. de Soet, *An evaluation of the accuracy of labeling of percent sodium hypochlorite on various commercial and professional sources: is sodium hypochlorite from these sources equally suitable for endodontic irrigation?* J Endod, 2014. **40**(12): p. 2049-52.

43. Wang, Z., Y. Shen, and M. Haapasalo, *Dynamics of Dissolution, Killing, and Inhibition of Dental Plaque Biofilm*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 964.
44. Stojicic, S., et al., *Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant*. J Endod, 2010. **36**(9): p. 1558-62.
45. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite*. J Endod, 2000. **26**(6): p. 331-4.
46. Forough Reyhani, M., et al., *Antibacterial effect of different concentrations of sodium hypochlorite on Enterococcus faecalis biofilms in root canals*. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2017. **11**(4): p. 215-221.
47. Sim, T.P., et al., *Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain*. Int Endod J, 2001. **34**(2): p. 120-32.
48. Pascon, F.M., et al., *Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review*. J Dent, 2009. **37**(12): p. 903-8.
49. Mostafa, M., et al., *Postoperative pain following endodontic irrigation using 1.3% versus 5.25% sodium hypochlorite in mandibular molars with necrotic pulps: a randomized double-blind clinical trial*. Int Endod J, 2020. **53**(2): p. 154-166.
50. Demenech, L.S., et al., *Postoperative Pain after Endodontic Treatment under Irrigation with 8.25% Sodium Hypochlorite and Other Solutions: A Randomized Clinical Trial*. J Endod, 2021. **47**(5): p. 696-704.
51. Kanagasingam, S. and I.R. Blum, *Sodium Hypochlorite Extrusion Accidents: Management and Medico-Legal Considerations*. Prim Dent J, 2020. **9**(4): p. 59-63.

52. Cieplik, F., et al., *Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern?* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 587.
53. Gomes, B.P., et al., *Chlorhexidine in endodontics*. Braz Dent J, 2013. **24**(2): p. 89-102.
54. McDonnell, G. and A.D. Russell, *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 147-79.
55. Vianna, M.E., et al., *In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **97**(1): p. 79-84.
56. Ruksakiet, K., et al., *Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials*. J Endod, 2020. **46**(8): p. 1032-1041.e7.
57. Busanello, F.H., et al., *Chemical biofilm removal capacity of endodontic irrigants as a function of biofilm structure: optical coherence tomography, confocal microscopy and viscoelasticity determination as integrated assessment tools*. Int Endod J, 2019. **52**(4): p. 461-474.
58. Del Carpio-Perochena, A., et al., *Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants*. Dent Res J (Isfahan), 2014. **11**(4): p. 442-7.
59. Mahendra, A., et al., *Comparative evaluation of antimicrobial substantivity of different concentrations of chlorhexidine as a root canal irrigant: An in vitro study*. J Oral Biol Craniofac Res, 2014. **4**(3): p. 181-5.
60. Basrani, B.R., et al., *Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate*. J Endod, 2007. **33**(8): p. 966-9.

61. Bueso, V., et al., *Comparative evaluation of intermediate solutions in prevention of brown precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate*. Clin Exp Dent Res, 2022. **8**(6): p. 1591-1597.
62. Marchesan, M.A., et al., *Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **103**(5): p. e103-5.

## **CAPÍTULO 2**

### **O POTENCIAL DE EXTRATO DE PLANTAS NA COMPOSIÇÃO DE MATERIAIS ENDODÔNTICOS: UMA REVISÃO NARRATIVA**

ARTIGO FORMATADO NAS NORMAS DA REVISTA

*“BRAZILIAN ORAL RESEARCH”*

## 2 CAPÍTULO 2 – O POTENCIAL DE EXTRATO DE PLANTAS NA COMPOSIÇÃO DE MATERIAIS ENDODÔNTICOS: UMA REVISÃO NARRATIVA

### RESUMO

A busca por materiais com aceitável biocompatibilidade e atividade antimicrobiana eficaz, tem levado à descoberta de diversos fitoterápicos que podem ser alternativos ao uso de produtos tradicionais no tratamento endodôntico. A presente revisão narrativa visa realizar um levantamento sobre a temática de produtos fitoterápicos na endodontia, a fim de atualizar os profissionais a cerca da possibilidade de uso dessas soluções na rotina clínica. Foi realizada uma busca nas bases de dados PubMed, Scopus e Scielo utilizando uma estratégia de busca com os termos ("*natural product*" AND *endodontic*) sem restrição de idioma ou data de publicação. Foram incluídos estudos que abordassem o uso de produtos naturais na endodontia. A pesquisa bibliográfica inicial recuperou 83 estudos e após a remoção de duplicatas, 27 estudos foram selecionados para compor a revisão. Os estudos apresentam dados a cerca dos procedimentos endodônticos de capeamento pulpar, desinfecção, obturação e terapia endodôntica em dentes dedícuos. Conclui-se que o uso de extrato de plantas na composição de formulações para uso endodôntico tem apresentado resultado promissores, porém mais estudos laboratoriais e, posteriormente, clínicos são necessários para aplicação dos fitoterápicos na rotina clínica.

**Palavras-chave:** Tratamento do Canal Radicular, Endodontia, Medicina Herbária, Produtos Naturais.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais no tratamento de doenças constitui um dos pilares fundamentais da origem da medicina moderna [1]. Os medicamentos fitoterápicos, por sua vez, são formulações compostas por materiais vegetais, processados ou crus, contendo elementos de uma ou mais plantas com propriedades medicinais [2]. Enquanto isso, o conceito de fitoterapia é dado a prática terapêutica que se utiliza de fármacos cujos princípios ativos são derivados de plantas ou de seus componentes, tendo origem no conhecimento e no uso popular. As plantas utilizadas para tal fim são tradicionalmente referidas como medicinais [3]. Nos últimos anos, estes produtos têm conquistado relevância na comunidade médica e odontológica, devido a biocompatibilidade, a alta atividade antimicrobiana, e a propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias [1].

Os fitoterápicos podem ser apresentados para uso na forma de soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas, infusões, comprimidos, cápsulas, pomadas ou gel. Além do mais, destaca-se pelo baixo custo e pela acessibilidade à população [4]. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) recomendou a elaboração de políticas nacionais voltadas à inserção da medicina complementar e alternativa aos sistemas de saúde, com foco na atenção primária, através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) [5]. Essa política traz diretrizes e ações para realização de serviços e utilização de produtos relacionados à acupuntura, homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia. Enquanto na Odontologia, a fitoterapia foi regulamentada em novembro de 2008 pelo Conselho Federal de Odontologia, pela resolução nº 082/2008, concedendo reconhecimento ao trabalho do cirurgião-dentista nas práticas integrativas e complementares de saúde bucal, tal como a fitoterapia [6].

O emprego de materiais a base de extrato de plantas na área da endodontia se desenrola no decorrer do tratamento endodôntico. Estes produtos são desenvolvidos com a finalidade de realizar a limpeza e desinfecção de canais radiculares, atuar como medicamentos intracanaís, servir como cimentos seladores e facilitar a remoção de material obturador [7]. A busca por novos materiais, com aceitável biocompatibilidade e atividade antimicrobiana eficaz, tem levado à descoberta de diversos fitoterápicos que podem ser alternativos ao uso de produtos tradicionais no tratamento

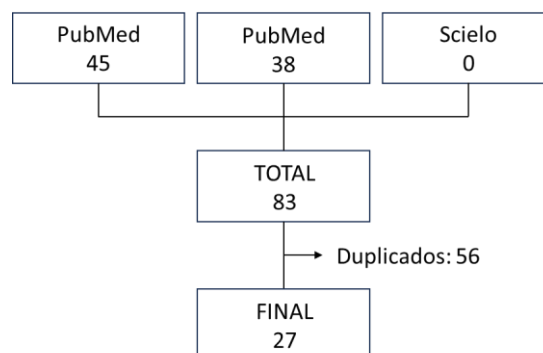
endodôntico. No entanto, se analisados isoladamente, os estudos de tais descobertas não fornecem informações suficientes para análise crítica e aplicação na prática clínica. Sendo assim, a presente revisão narrativa visa realizar um levantamento sobre a temática de produtos fitoterápicos na endodontia, com ênfase em soluções irrigadoras, a fim de atualizar os profissionais a cerca da possibilidade de uso dessas soluções na rotina clínica.

## 2.2 METODOLOGIA

Foi realizada uma busca nas seguintes bases de dados: PubMed, Scopus e Scielo utilizando uma estratégia de busca com os termos (*“natural product” AND endodontic*) sem restrição de idioma ou data de publicação. Foram incluídos estudos que abordassem o uso de produtos naturais na endodontia, e excluídos aqueles utilizados em outras especialidades odontológicas, ou que não estivessem relacionados com os tecidos pulpare e periradiculares e o tratamento de canal radicular. Os resultados foram agrupadas de acordo com os procedimentos clínicos endodônticos.

## 2.3 RESULTADOS

A pesquisa bibliográfica inicial recuperou 83 estudos: 45 do PubMed, 38 do Scopus, e 0 do Scielo. Após a remoção de duplicatas, 27 estudos foram incluídos na presente revisão narrativa (imagem 1).



**Imagem 1** – Seleção dos estudos

### 2.3.1 Capeamento Pulpar

Dos diversos procedimentos realizados na prática clínica, um de extrema relevância para a sobrevivência dentária é o capeamento pulpar, na qual o componente reparador deve estimular biologicamente as células odontoblásticas e proporcionar a formação de tecido duro sobre a polpa exposta [8]. O material de escolha com ampla aceitação para a realização de tal procedimento é o hidróxido de cálcio. Entretanto, há como desvantagens no seu uso o efeito cáustico ocasionado na polpa e uma má qualidade de ponte dentinária formada abaixo do  $\text{Ca(OH)}_2$  [9].

Uma das alternativas naturais propostas para o recobrimento pulpar é o uso de acemanana, um componente extraído das folhas de aloe vera. Siriporn Songsiripraduboon, *et. al.* (2015) comparou respostas clínicas, radiográficas e histológicas, imediatamente e após seis meses, entre o uso de acemanana e hidróxido de cálcio utilizado no capeamento pulpar direto de 47 dentes decíduos, próximos à esfoliação. Imediatamente, ambos os grupos testados apresentaram sucesso clínico. Após seis meses, a taxa de sucesso clínico e radiográfico foi de 72,7% para o grupo tratado com acemanana e 70% para o grupo tratado com hidróxido de cálcio. Histologicamente, 77% do grupo acemanana demonstrou nenhuma ou leve inflamação no local de exposição, 44% formaram ponte dentinária completa e 33% ponte dentinária parcial. Enquanto no grupo  $\text{Ca(OH)}_2$ , todos os dentes apresentaram inflamação pulpar moderada ou grave, nenhum dente obteve formação de ponte dentinária completa e em 40% houve uma formação parcial. Em suma, os resultados sugerem que acemanana oferece uma alternativa promissora para terapia pulpar de dentes vitais [10].

### 2.3.2 Desinfecção e Soluções Irrigadoras

Em situações na qual o diagnóstico pulpar é irreversível ou necrótico e requer como tratamento a realização do tratamento de canal radicular, é imprescindível a escolha de agentes irrigantes para limpeza e desinfecção dos condutos radiculares. Atualmente, o primeiro irrigante de escolha é o hipoclorito de sódio, que apresenta notável atividade antimicrobiana e capacidade de dissolução de tecidos, entretanto,

há como desvantagem a potencial citotoxicidade [11]. A clorexidina, outro irrigante comumente utilizado, apresenta bom espectro antimicrobiano, porém não há desintegração tecidual [12].

Um estudo com soluções fitoterápicas, avaliou qualitativamente o crescimento bacteriano após o uso de *triphala*, formulação fitoterápica da união de três frutas secas em pó (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* e *Emblica officinalis*), e demonstrou inibição completa de crescimento em biofilme de *Enterococcus faecalis* de três semanas. Outro fitoterápico testado como irrigante no estudo foram os polifenóis de chá verde (*Camellia sinensis*), este diminuiu o crescimento bacteriano, porém não apresentou inibição completa. O hipoclorito de sódio a 5% apresentou atividade antimicrobiana superior aos demais, no entanto, visto as características indesejadas do NaOCl, o uso dos fitoterápicos ainda se apresenta como uma alternativa vantajosa [13].

Tyagi SP, *et. al.* (2013), ao comparar a atividade antifúngica *in vitro* de soluções de própolis, *morinda citrifolia*, e *azadirachta indica* (*neem*) contra biofilmes de *Candida albicans*, verificou que os grupos tratados com *neem* e própolis exibiram maior eficácia contra o microrganismo, sendo que própolis teve ação semelhante ao NaOCl 5%, sem diferença estatística entre eles, sugerindo uma alternativa promissora como irrigante radicular [14].

O quadro 1, abaixo, exhibe outros compostos fitoterápicos que tem sido estudados para serem utilizados na desinfecção do conduto radicular durante a terapia endodôntica [15].

**Quadro 1** - Alternativas fitoterápicas estudadas como materiais em endodontia. Adaptado de: Vishnuvardhini.S, Sivakumar A, Ravi V, Prasad A. S, Sivakumar J. S. *Herbendodontics–Phytotherapy In Endodontics: A Review. Biomed Pharmacol J* 2018;11(2).

<b>Nome Científico</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Efeito</b>
<b><i>Azadirachta indica</i></b>	<i>Neem</i> (diversos produtos comerciais)	Nimbina, nimbidina, nimbolide e ácido nimbidínico	Irrigação	- Antibacteriano
<b><i>Melaleuca alternifolia</i></b>	<i>Tea tree</i> (diversos produtos comerciais)	<i>Terpinen-4-ol</i> e $\alpha$ - <i>terpineno</i>	Irrigação/ desinfetante cavitário	- Antibacteriano - Antifúngico
<b><i>Curcuma longa linn</i></b>	Acafrão da terra (diversos produtos comerciais)	Curcuminóide, tumerona, atlantona e zingiberona	Irrigação/ medicação	- Antimicrobiano - Anti-inflamatório - Antioxidante - Anticarcinogênico - Antimutagênico - Antifúngico - Anticoagulante
<b><i>Morinda citrifolia</i></b>	Noni (diversos produtos comerciais)	<i>Acubin</i> , <i>L-asperuloside</i> , <i>atizarin</i> e <i>anthraquinone</i>	Irrigação	- Antimicrobiano - Antitumorais - Anti-inflamatórias - Analgésicas - Anti-helmínticas
<b><i>Triphala (Terminalia bellerica, Terminalia chebula e Emblica officinalis)</i></b>	<i>Triphala</i> (diversos produtos comerciais)	Taninos, quinonas, flavonóides, ácido gálico e vitamina C	Irrigação/ medicação	- Bacteriostático - Bactericida
<b><i>Syzygium aromaticum</i></b>	Cravo da Índia (diversos produtos comerciais)	Eugenol, isoeugenol e vanilina	Irrigação	- Antioxidante - Antibacteriano - Anódino
<b><i>Acácia nilótica</i></b>	Acácia nilótica (diversos produtos comerciais)	Taninos, compostos fenólicos, óleos essenciais e flavonóides	Irrigação	- Antimicrobiano - Antioxidante - Antifúngico - Antiviral - Antibiótico
<b><i>Allium sativa</i></b>	Alho (extrato de alho – diversos produtos comerciais)	Alicina	Irrigação/ medicação	- Antimicrobiano
<b><i>Zingiber officinale</i></b>	Gengibre (extrato glicólico de gengibre – diversos	<i>Zingerone</i> , <i>gingerol</i> e <i>6-shagoal</i>	Irrigação/ medicação	- Anti-inflamatório - Analgésico - Antipirético

	produtos comerciais)			- Antimicrobiano - Hipoglicêmico
<b><i>Própolis</i></b>	Extrato de própolis (extrato glicólico de própolis - diversos produtos comerciais)	Flavonóides e derivados do ácido cinâmico	Irrigação/medicação	- Antioxidante - Antiviral - Anti-inflamatório - Antibacteriano - Antifúngico - Antitumoral - Imunomodulador
<b><i>Aloe barbadensis</i></b>	Aloe vera (diversos produtos comerciais)	Aloína e aloe-emodina	Irrigação/medicação/desinfetante cavitário	- Antibacteriano
<b><i>Agaricus bisporus</i></b>	Cogumelo (diversos produtos comerciais)	Plectasina, confuentina, grifolina e neogrifolina	Medicação	- Imunomodulador - Anti-inflamatório - Antiviral - Antioxidante - Antimicrobiano
<b><i>Arctium lappa</i></b>	Bardana (óleo de raiz de bardaba – diversos produtos comerciais)	Lactonas sesquiterpênicas e insulina	Medicação	- Antibacteriano - Antifúngico - Antiplaquetário - Antioxidante - Diurético - Ansiolítico
<b><i>Glycyrrhiza glabra</i></b>	Alcaçuz / Regaliz / Raiz doce (diversos produtos comerciais)	Composto triterpenóide, Glicirrizina	Irrigação/medicação	- Anti-inflamatório - Antiviral - Anticancerígeno
<b><i>Vaccinium macrocarpon</i></b>	<i>Cranberry</i> (diversos produtos comerciais)	Flavonóides, ácidos fenólicos, antocianinas e taninos condensados	Irrigação	- Antibacteriano - Antimicrobiano
<b><i>Psidium guajava</i></b>	Goiaba (diversos produtos comerciais)	<i>Guajaverin</i>	Irrigação	- Anti-inflamatório - Antimicrobiano - Antioxidante - Antimutagênico
<b><i>Ricinus communis</i></b>	Rícino (Endoquil - Poliquil, Polímeros Químicos LTDA., Araraquara, São Paulo, Brasil)	Ácido ricinoléico	Irrigação/medicação	- Antimicrobiano
<b><i>Citrus aurantium</i></b>	<i>Petitgrain</i> (diversos produtos comerciais)	Limoneno, linalol, $\beta$ -Ocimeno, sabinene	Irrigação/medicação/solubilização	- Antimicrobiano - Antioxidante

As substâncias auxiliares, muita das vezes, possuem boa atividade antimicrobiana, porém pouca capacidade de remoção dos detritos gerados após o preparo químico-mecânico, sendo necessárias substâncias quelantes para remoção da camada de esfregaço [16]. O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é uma solução quelante comumente utilizada para este fim, uma vez que sua reação com íons cálcio na dentina ocasiona a quelação do cálcio, promovendo a descalcificação da dentina [17]. Como desvantagem, pode apresentar erosões dentinárias e diminuição da microdureza [18].

Um estudo recente avaliou a eficácia da decocção de folhas de *morinda oleifera*, em concentrações de 2,5% e 5%, na remoção da camada de esfregaço, após o preparo dos dentes, irrigação, e posterior visualização em microscopia confocal, em comparação com NaOCl 2,5% e EDTA 17%, e verificou que a moringa 2,5% e 5% tiveram efetividade semelhante e ambas foram mais eficazes que NaOCl 2,5% e EDTA 17% na remoção da camada de esfregaço [19].

### **2.3.3 Participação de Óleos Essenciais nos Cimentos Endodônticos**

A fim de se alcançar o objetivo da terapia endodôntica, de conter infecções, é desejável a utilização de materiais obturadores que apresentem ideal capacidade de vedação e propriedades antimicrobianas, uma vez que há evidências que sugerem que mesmo após o tratamento endodôntico alguns microrganismos podem persistir, interferindo na cicatrização e no reparo apical [20]. Neste contexto, Dos Santos DC, *et. al.* (2021) avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Tagetes minuta*, e da tintura de *Bixa orellana* adicionados em cimentos endodônticos. A atividade antimicrobiana foi testada contra *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, através da avaliação da concentração inibitória mínima, por micro diluição em caldo e contato direto. Após o experimento, observaram que as propriedades físicas dos cimentos, como tempo de pega, grau de conversão, estabilidade dimensional, radiopacidade, fluidez e espessura não foram influenciadas pela adição dos extratos fitoterápicos. Quanto à atividade antimicrobiana, todos os cimentos experimentais tiveram efeito antimicrobiano sobre *E. faecalis*, sendo que *T. minuta* inibiu totalmente o crescimento após 1 hora de incubação. Em *C. albicans*, o cimento *T. minuta* demonstrou efeito antifúngico após 24

horas, enquanto os demais não tiveram efeitos significantes. Ademais, para *S. mutans*, os cimentos *T. minuta* e *B. orellana* tiveram considerável efeito antimicrobiano após 24 horas [21].

Em situações clínicas onde há falha do tratamento endodôntico primário, faz-se necessário a remoção do material obturador para início de um novo tratamento. O material obturador comumente utilizado na prática clínica é a guta-percha. Alguns óleos essenciais se mostraram eficazes em sua solubilização, juntamente os cimentos endodônticos utilizados, dentre eles, destaca-se o óleo de laranja (*Citrus aurantium*), *tea tree* (*Aetheroleum melaleuca*) e o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) [22]. Estes óleos se mostraram eficientes, sendo uma alternativa a materiais tradicionais, tal como o clorofórmio [22].

#### **2.3.4 Terapia Endodôntica em Dentes Decíduos**

O desenvolvimento de pesquisas sobre produtos naturais com propriedades terapêuticas tem avançado significativamente nos últimos anos, e em especial para uso em tratamento endodôntico de dentes decíduos. Vitali FC, *et. al.* (2022), realizaram uma revisão de escopo coletando informações sobre a segurança e eficácia de tais produtos a fim de verificar se a prática clínica em dentes decíduos tem evidência científica suficiente. Após a busca na literatura e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 37 estudos foram selecionados para a análise qualitativa. No geral, 17 produtos naturais foram investigados, com as finalidades de: medicamento para pulpotomia, solução irrigadora, medicamento intracanal e material obturador de canal radicular. Grande parte dos estudos revelou eficácia semelhante entre os fitoterápicos e os produtos sintéticos tradicionais, utilizados como comparativos, entretanto, muitos estudos apresentaram vieses metodológicos. Sendo assim, concluíram que as evidências disponíveis ainda são insuficientes para a aplicação de produtos naturais de forma segura. O que enfatiza, não apenas para odontopediatria, como também para a prática clínica em geral, a necessidade de mais estudos com fitoterápicos para utilização destes produtos naturais na rotina clínica.

## 2.4 DISCUSSÃO

A presente revisão de literatura foi conduzida a fim de realizar um levantamento sobre a temática de produtos fitoterápicos na endodontia e compilar informações acerca da possibilidade de uso desses produtos na rotina clínica. Os estudos analisados demonstraram que produtos à base de extratos de plantas podem ser utilizados em diversas etapas do tratamento endodôntico. Dentre esses, há maior quantidade de extratos experimentais sendo avaliados para uso no processo de desinfecção dos condutos radiculares, como soluções irrigadoras ou medicamentos intracanáis.

Muitos produtos naturais se mostraram promissores na erradicação de microrganismos em estudos *in vitro*. Melander RJ, *et. al.* (2022) observaram, em diversos estudos, que muitos destes produtos são eficazes na inibição de biofilmes orais [23]. Embora os mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos, sabe-se que os fitoterápicos podem atuar nas principais fases de desenvolvimento do biofilme: adesão, proliferação, maturação e dispersão [24]. Além disso, a terapia herbal da medicina tradicional chinesa tem sido utilizada há anos no tratamento de diversas doenças orais comuns, apesar de ser pouco compreendida por profissionais ocidentais [25].

Dentre as vantagens de utilizar produtos fitoterápicos estão o baixo custo e a ampla disponibilidade. Para sua comercialização, é essencial que o fitoterápico esteja registrado no Ministério da Saúde [26]. Há no Brasil um composto baseado no extrato de *Ricinus communis*, Endoquil, (detergente de óleo de rícino), que já se encontra em comercialização com a finalidade de irrigação de canais radiculares no tratamento endodôntico [27]. Os demais fitoterápicos possuem formulações comerciais, porém para usos diversos, ainda estando em fase experimental para serem utilizados durante a terapia endodôntica, muitos deles apresentando resultados promissores para uso clínico.

O produto natural mais utilizado, dentre os estudos analisados foi o própolis, tendo sua atividade antimicrobiana avaliada em 6 estudos, de forma isolada ou combinada com outros materiais, em concentrações que variaram de 5% à 25% [28-33]. O grande interesse em seu uso se deve, possivelmente, pelo seu efeito antibacteriano dos flavonoides que atuam no processo de síntese de DNA ou RNA

bacteriano [34]. Além disso, há extensas avaliações sobre o própolis em outras áreas medicinais, comprovando sua eficácia como medicamento fitoterápico, e fornecendo embasamento para a investigação de sua eficácia na endodontia [35].

A segurança quanto à biocompatibilidade não foi testada na maior parte dos estudos, porém nos ensaios clínicos realizados com crianças não foram relatadas condições graves após o uso de materiais fitoterápicos. Embora o sucesso clínico tenha sido obtido em alguns ensaios clínicos randomizados, não se pode estimar completamente os efeitos adversos e as complicações sistêmicas e locais ocasionadas por incidentes relacionados aos compostos à base de extrato de plantas.

Em suma, presume-se que são necessários mais estudos que avaliem a eficácia de produtos naturais para uso como materiais endodônticos, investigando sua concentração inibitória mínima e a concentração que ocasiona a toxicidade e estimando dos possíveis efeitos adversos em casos de incidentes com tais produtos. Ademais, os produtos avaliados até o momento apresentam resultados promissores que podem futuramente ser opções viáveis para substituição de produtos sintéticos utilizados atualmente.

## 2.5 CONCLUSÕES

O uso de extrato de plantas na composição de formulações para uso endodôntico vem aumentando nos últimos anos, e os resultados obtidos até o momento são promissores. No entanto, a maior parte dos estudos disponíveis se encontram no nível de estudos laboratoriais, e ainda assim há poucos estudos referentes ao mesmo fitoterápico, com a finalidade comprovar sua eficácia. Desse modo, mais estudos são necessários para a confirmação da efetividade dos fitoterápicos e sua posterior utilização no meio clínico.

## 2.6 REFERÊNCIAS

1. Parle, M. and N. Bansap, Herbal Medicines: Are they safe? Nat. Prod. Radiance, 2006. 5.
2. Karobari, M.I., et al., Herbal Medications in Endodontics and Its Application-A Review of Literature. Materials (Basel), 2022. 15(9).
3. de Pasquale, A., Pharmacognosy: the oldest modern science. J Ethnopharmacol, 1984. 11(1): p. 1-16.
4. Meccatti, V.M. and L.S.d. Carvalho ENDODONTIA E PLANTAS MEDICINAIS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA in Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral. 2023, UNIPAR - Universidade Paranaense: Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR p. 12.
5. Saúde, M.d., Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde . in Cadernos de Atenção Básica 2012, Departamento de Atenção Básica Brasília.
6. RESOLUÇÃO CFO-82, de 25 de setembro de 2008 C.F.d. Odontologia, Editor. 2008: Rio de Janeiro.
7. Almadi, E.M. and A.A. Almohaimede, Natural products in endodontics. Saudi Med J, 2018. 39(2): p. 124-130.
8. Kopel, H.M., The pulp capping procedure in primary teeth "revisited". ASDC J Dent Child, 1997. 64(5): p. 327-33.
9. Olsson, H., K. Petersson, and M. Rohlin, Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. Int Endod J, 2006. 39(6): p. 429-42.

10. Songsiripraduboon, S., et al., Clinical, radiographic, and histologic analysis of the effects of acemannan used in direct pulp capping of human primary teeth: short-term outcomes. *Odontology*, 2016. 104(3): p. 329-37.
11. Cai, C., et al., Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. *Biomed Res Int*, 2023. 2023: p. 8858283.
12. Busanello, F.H., et al., Chemical biofilm removal capacity of endodontic irrigants as a function of biofilm structure: optical coherence tomography, confocal microscopy and viscoelasticity determination as integrated assessment tools. *Int Endod J*, 2019. 52(4): p. 461-474.
13. Prabhakar, J., et al., Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod*, 2010. 36(1): p. 83-6.
14. Tyagi, S.P., et al., Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. *J Conserv Dent*, 2013. 16(6): p. 532-5.
15. S, A., et al., Herbendodontics – Phytotherapy In Endodontics: A Review. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 2018. 11: p. 1073-1082.
16. Park, E., Y. Shen, and M. Haapasalo, Irrigation of the apical root canal. *Endodontic Topics*, 2012. 27(1): p. 54-73.
17. FR, v.d.F. and N.-O.s. B, Effect of EDTA and sulfuric acid on root canal dentine. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 1963. 16: p. 199–205.

18. Violich, D.R. and N.P. Chandler, The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J*, 2010. 43(1): p. 2-15.
19. Natsir, N., et al., Antibacterial and smear layer removal efficacy of moringa (*Moringa oleifera*): An in vitro study. *J Taibah Univ Med Sci*, 2023. 18(6): p. 1493-1499.
20. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999. 284(5418): p. 1318-22.
21. Dos Santos, D.C., et al., Antimicrobial and physical properties of experimental endodontic sealers containing vegetable extracts. *Sci Rep*, 2021. 11(1): p. 6450.
22. Opacic-Galic, V., et al., In vitro study of essential oils efficacy as alternative solvents in endodontic retreatment. *Stomatoloski glasnik Srbije*, 2021. 68: p. 173-180.
23. Melander, R.J., A.K. Basak, and C. Melander, Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Nat Prod Rep*, 2020. 37(11): p. 1454-1477.
24. Chi, Y., et al., Natural products from traditional medicine as promising agents targeting at different stages of oral biofilm development. *Front Microbiol*, 2022. 13: p. 955459.
25. Zheng, L.W., H. Hua, and L.K. Cheung, Traditional Chinese medicine and oral diseases: today and tomorrow. *Oral Dis*, 2011. 17(1): p. 7-12.
26. Sanitária, A.N.d.V., RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014, M.d. Saúde, Editor. 2014. p. 1-34.
27. Leonardo, M.R., et al., In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod*, 2001. 27(12): p. 717-9.

28. Kumar, V.M., et al., The antimicrobial effectiveness of 25% propolis extract in root canal irrigation of primary teeth. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 2014. 32(2): p. 120-124.
29. Madani, Z., et al., Propolis nanoparticle enhances antimicrobial efficacy against *Enterococcus faecalis* biofilms. *South African Journal of Botany*, 2022. 150: p. 1220-1226.
30. Parolia, A., et al., Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. *BMC Oral Health*, 2020. 20(1): p. 339.
31. Fabri, F.V., et al., Preparation and characterization of bioadhesive systems containing propolis or sildenafil for dental pulp protection. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011. 37(12): p. 1446-54.
32. Rojaramya, K., et al., In vivo evaluation of zinc oxide-propolis mixture as root canal filling material in the primary molars: A 24-month follow-up randomized controlled trial. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 2020. 38(2): p. 171-176.
33. Shabbir, J., et al., Effect of Chinese propolis as an intracanal medicament on post-operative endodontic pain: A double-blind randomized controlled trial. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020. 17(2).
34. Ahangari, Z., M. Naseri, and F. Vatandoost, Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran Endod J*, 2018. 13(3): p. 285-292.
35. Przybyłek, I. and T.M. Karpiński, Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*, 2019. 24(11).

## **CAPÍTULO 3**

### **EFICÁCIA DE UMA SOLUÇÃO IRRIGADORA EXPERIMENTAL BASEADA EM *TEA TREE AND PETITGRAIN OILS* CONTRA BIOFILME MICROBIANO: UM ESTUDO COMPARATIVO *IN VITRO***

ARTIGO FORMATADO NAS NORMAS DA REVISTA

*“JOURNAL OF DENTAL RESEARCH”*

### 3 CAPÍTULO 3 – EFICÁCIA DE UMA SOLUÇÃO IRRIGADORA EXPERIMENTAL BASEADA EM *TEA TREE AND PETITGRAIN OILS* CONTRA BIOFILME MICROBIANO: UM ESTUDO COMPARATIVO *IN VITRO*

#### RESUMO

**Introdução:** O sucesso do tratamento endodôntico é dependente de múltiplos fatores que visam a eliminação da microbiota cultivável nos canais radiculares, e o uso de soluções irrigadoras é imprescindível. **Objetivo:** avaliar a eficácia antimicrobiana da associação dos óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (Citrus aurantium)* como solução irrigadora do canal radicular. **Métodos** Um biofilme múltiplo, composto por *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans* foi exposto às soluções irrigadoras em três grupos experimentais: solução fitoterápica 100%, clorexidina (CHX) 2%, hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, e em um grupo controle, composto por meio de cultura. Foi avaliada a viabilidade dos microrganismos através dos experimentos de MTT e LIVE/DEAD com posterior visualização em microscopia confocal e de varredura (MEV). **Resultados:** O teste ANOVA revelou diferença estatística significativa em ensaio MTT, entre a média da quantidade de microrganismos viáveis após a exposição aos irrigantes testados ( $p = 0,000$ ,  $F = 330,8$ ), assim como na viabilidade avaliada em teste LIVE/DEAD ( $p = 0,000$ ,  $F = 248,38$ ). A microscopia de varredura mostrou maior redução do biofilme após exposição à NaOCl 2,5%, seguido de solução fitoterápica e CHX 2%. **Conclusão:** Os óleos essenciais se mostraram neste estudo eficazes contra os microrganismos organizados em biofilme múltiplo, superior a clorexidina 2%, porém, com ação antimicrobiana inferior ao NaOCl 2,5%. A busca por novas soluções irrigadoras ainda é essencial no campo da endodontia, uma vez que ainda não há no meio clínico nenhum irrigante do canal radicular que proporcione conjuntamente todas as características ideais desejadas.

**Palavras-chave:** Tratamento do Canal Radicular, Endodontia, Óleo de Melaleuca, Citrus, Hipoclorito de Sódio, Clorexidina.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico é dependente de múltiplos fatores que visam a eliminação da microbiota cultivável nos canais radiculares [1, 2]. Entretanto, alguns desafios são encontrados no processo de desinfecção, tais como a presença de biofilmes microbianos aderidos às superfícies dentinárias e a complexidade anatômica do sistema de canais de radiculares, pela presença de istmos, canais acessórios ou ramificações apicais, inacessíveis aos instrumentos durante a preparação mecânica [3, 4]. Desta forma, a fim de se obter a eficaz desinfecção do canal radicular e prevenir reinfecções, o uso de soluções irrigadoras faz-se necessário no decorrer do tratamento endodôntico [1, 3].

A presença de microrganismos e seus produtos são os principais responsáveis por infecções pulpares e periapicais, em especial, quando organizados em biofilmes, induzem o surgimento da periodontite apical [5]. As células bacterianas quando organizadas em biofilmes são consideradas formadoras de *habitat*, uma vez que ao gerar a matriz extracelular formam uma base física para o crescimento e estabilidade do biofilme subsequente, o que o difere de microrganismos de vida livre. Algumas propriedades derivam desta forma de auto-organização complexa, tais como: gradientes localizados que favorecem a diversidade de *habitat*, obtenção de recursos por sorção, retenção de enzimas que proporcionam a digestão, interações sociais, e resistência à exposição de antibióticos e antimicrobianos [6]. A organização de microrganismos em múltiplas camadas incorporados em substância polimérica extracelular produz diversas condições de resistência à agentes antimicrobianos [7]. Sendo assim, além de irrigação abundante durante do preparo químico-mecânico, é essencial que o irrigante contenha propriedades específicas como amplo espectro de ação antimicrobiana, inativação de fatores de virulência, e em especial, ruptura de biofilme com ausência de efeitos adversos [3].

As soluções irrigadoras amplamente utilizadas atualmente na prática clínica são o hipoclorito de sódio (NaOCl), e o digluconato de clorexidina (CHX). Ambas apresentam um bom espectro de ação, entretanto, possuem desvantagens como a característica cáustica do NaOCl, preocupante em casos de extrusões inadvertidas, e

a incapacidade da clorexidina de dissolução de tecidos necróticos e menor efetividade em bactérias gram-negativas [1, 3]. Kasidid Ruksakiet, *et al.* (2020), em uma revisão sistemática e meta-análise, comparando clinicamente a eficácia antimicrobiana de hipoclorito de sódio e clorexidina, concluíram que ambos reduziram significativamente a carga microbiana dos canais radiculares, mas não completamente, ainda necessitando de agentes antibacterianos mais potentes [8]. Apesar de tais conhecimentos, ainda não há no meio clínico nenhuma solução irrigadora do canal radicular que proporcione conjuntamente todas as características ideais, ou ao menos um bom espectro antimicrobiano associado a uma biocompatibilidade aceitável com os tecidos periapicais. Nesse contexto, torna-se plausível a investigação de novas substâncias irrigadoras para uso durante o preparo químico-mecânico.

Soluções fitoterápicas adquiriram destaque nos últimos anos na área médica e odontológica devido suas características anti-inflamatórias e analgésicas, [9]. Tais características têm sido relatadas nos óleos essenciais de *tea tree* e *petitgrain*. O *tea tree* é extraído das folhas de *Melaleuca alternifolia*, e é conhecido tradicionalmente contra infecções microbianas. Seu uso tem se mostrado eficaz na odontologia como potente antimicrobiano na redução da placa dentária e da inflamação gengival quando avaliado como integrante na composição de enxaguantes bucais [10, 11]. Algumas pesquisas apontam que o óleo de *tea tree* é biodegradável, biocompatível, e apresenta pouca resistência microbiana [12]. Além disso, as reações graves são extremamente raras na ausência de ingestão [13]. Em consonância, o óleo de *petitgrain* tem sido descrito como eficaz antimicrobiano e potente antioxidante devido ao alto teor de limoneno presente em sua composição [14]. Em um estudo *in vitro*, o óleo de *Petitgrain (citrus aurantium)* foi eficaz no crescimento e na ruptura de biofilmes de *Streptococcus mutans* [14]. A associação fitoterápica dos óleos de *tea tree* e *petitgrain*, acrescido de *stévia*, um adoçante natural, compõe o enxaguante bucal Inphoral, o qual foi modificado para avaliação de seu potencial antimicrobiano e é a solução experimental deste estudo. A mesma formulação também se encontra disponível comercialmente na forma de gel bucal para utilização em bebês. Entretanto, não há na literatura evidências suficientes para a prática clínica em relação ao potencial antimicrobiano destes óleos essenciais como solução irrigadora do canal radicular na terapia endodôntica.

Sendo assim, objetivo do presente estudo é avaliar *in vitro* a eficácia antimicrobiana da associação dos óleos essenciais *Tea Tree (Melaleuca alternifolia)* e *Petitgrain (citrus aurantium)* como solução irrigadora experimental em biofilme múltiplo, composto por *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, em comparação com NaOCl 2,5% e solução de digluconato de clorexidina 2%. A hipótese nula é de que não há diferença entre as soluções quanto à eficácia antimicrobiana.

### 3.2 METODOLOGIA

O presente estudo *in vitro* foi realizado seguindo as Diretrizes CRIS (lista de verificação para relatórios de estudos *in vitro*) [15]. As etapas metodológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde e no Laboratório de Biotecnologia, no Instituto de Ciências Biológicas, ambos na Universidade de Brasília.

#### 3.2.1 Cepas Bacterianas e Fúngica

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Manassas, VA, USA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Manassas, VA, USA), e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27843 (Manassas, VA, USA), e a cepa fúngica *Candida albicans* ATCC 10231 (Manassas, VA, USA). As características gerais dos microrganismos encontram-se no quadro 1.

**Quadro 1** – Características gerais dos microrganismos utilizados no estudo.

Microrganismo	ATCC	Coloração Gram	Morfologia
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	Gram positiva	cocos
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Gram positiva	cocos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27843	Gram negativa	Bacilos
<i>Candida albicans</i>	10231	Gram positivo	Dimórfico: levedura ou filamentoso.

### 3.2.2 Meios de Cultura e Condições de Crescimento

O preparo do meio de cultura *Brain Heart Infusion agar* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha) foi realizado a partir de 7,8g de meio de cultura em pó, solubilizados em 150mL de água destilada, em tubos de vidro. De forma semelhante, para o preparo do meio *Sabourraud Agar* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha), 6,5g do meio de cultura em pó foram diluídas em 100mL de água destilada. Os tubos foram vedados com papel pardo e colocados em autoclave à 120 °C para esterilização. Após o processo de esterilização a solução preparada foi depositada em placas de petri com cerca de 3mm de altura, de forma a cobrir uniformemente o fundo da placa.

Os microrganismos armazenados à -80 °C, foram transferidos para fluxo laminar, onde permaneceram por 10 minutos, até obter temperatura ambiente. Em seguida, as bactérias foram estriadas em BHI *agar* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha) e incubadas estaticamente à 37 °C por 24 horas. Por conseguinte, o fungo estriado em meio *Sabourraud agar* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha) e incubado em condições estáticas, por 48 horas à 30 °C.

Após crescimento em meio *agar*, uma colônia isolada de cada cepa bacteriana foi removida e inoculada em 10mL de caldo BHI preparada a partir de 11,1g de *Brain Heart Infusion Broth* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha) em pó, diluídos em 300mL de água destilada, e uma colônia isolada fúngica inoculada em 10mL de caldo *sabourraud Broth* (Kasvi, Madri, Espanha), advindos da diluição de 6g de *Sabourraud* em 600mL de água destilada. Ambos preparados de acordo com as proporções indicadas pelo fabricante. Os pré-inóculos foram levados para agitação em *shaker* (Thermo scientific MAXQ 6000, Canada, USA) por 24 horas, à 37 °C para cepas bactérias, e à 30 °C para cepa fúngica, por 48 horas.

### 3.2.3 Formação de Biofilme Multiespécie

Para o crescimento do biofilme múltiplo foi definida a uma densidade óptica (D.O.) de 0.3 para cada um dos microrganismos, com aproximadamente  $1,2 \cdot 10^8$  UFC/mL em absorvância de 600nm em espectrofotômetro (SpectraMax M3, Dispositivos Moleculares, Sunnyvale, CA, EUA) [16]. A fim de realizar a contagem da

quantidade de UFC, foram plaqueados 20µL de inóculo diluído (1:5000) com pérolas de vidro em ágar BHI para cepas bacterianas, à 37 °C por 24 horas, e em ágar *sabourraud* para cepa fúngica, a 30 °C por 72 horas. Após o período de incubação, as colônias isoladas foram contadas manualmente e foi realizado o seguinte cálculo para quantificação em microlitros:  $UFC/mL = n^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{diluição} \times 1/\text{volume inoculado (mL)}$ .

Resumidamente, os biofilmes foram crescidos em suportes produzidos por impressão 3D. O total de 28 suportes foram acondicionados nos poços de uma placa de cultura de 12 poços. Os inóculos foram adicionados seguindo as etapas a seguir: O inóculo de *Streptococcus mutans* foi adicionado em cada poço, e incubado em condições aeróbicas em *shaker* à 37 °C por 48 horas em meio de cultura BHI *Broth* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha). Após este período, o caldo inoculado foi retirado, e 0.3 OD de *Enterococcus faecalis* foi adicionado e incubado por 24 horas, em semelhantes condições. Em seguida, o material foi substituído pelo inóculo de *Candida albicans*, o qual permaneceu por 48 horas à 30 °C e o meio de cultura foi substituído por meio caldo *sabourraud Broth* (Kasvi, Madri, Espanha). Após 48 horas da adição de *C. albicans*, o meio de cultura caldo *sabourraud Broth* (Kasvi, Espanha) foi removido e o inóculo de *P. aeruginosa* foi adicionado, o qual permaneceu em estufa com agitação em *shaker* por 24 horas à 37 °C. Passado o período de 24 horas seguintes, o meio de cultura BHI *Broth* (BHI; Kasvi, Madri, Espanha) foi retirado e o meio de cultura foi renovado com caldo BHI, pelo mesmo período de 24 horas.

### 3.2.4 Exposição aos Antimicrobianos

Após o período de incubação e formação do biofilme, as amostras dos biofilmes foram alocadas aleatoriamente em três grupos: hipoclorito de sódio 2,5% (controle positivo), clorexidina 2% e solução advinda da associação dos óleos essenciais de *tea tree* e *petitgrain* a 100%. A solução fitoterápica experimental deste estudo é uma modificação do enxaguante bucal Inphloral. O controle negativo foi composto por solução DPBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

As amostras de biofilme multiespécie foram expostos aos antimicrobianos, em temperatura ambiente, em um total de 3,5mL de solução em cada poço, na placa de 12 poços, por 45 minutos, com agitação em *shaker*, com exceção do hipoclorito de

sódio, o qual permaneceu por 5 minutos em *shaker*. Após a exposição, as amostras de biofilmes foram transferidas para as respectivas placas de trabalho de cada experimento.

### 3.2.5 Ensaio MTT

A viabilidade dos microrganismos foi avaliada através do ensaio MTT (3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5- brometo de difeniltetrazólio). Após a exposição às soluções, as amostras de biofilmes foram lavadas passivamente em 1mL de solução salina tamponada com fosfato (DPBS Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Em seguida, as amostras de biofilmes foram transferidas para novas placas de 12 poços contendo 3mL de MTT em solução de PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em cada poço. As placas foram então incubadas por 4 horas a 37 °C.

Após o período de incubação, as amostras foram retiradas da solução de MTT e transferidas para tubos *eppendorfs* de 1mL contendo álcool isopropílico acidificado (álcool isopropílico, HCl 0,04N, Sigma-Aldrich) para realização de enxágue. Por seguinte, 150µL do soluto, obtido após o enxágue, foi plaqueado em triplicata em placa de 96 poços e levados para leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M3, Dispositivos Moleculares, Sunnyvale, CA, EUA) a um comprimento de onda de 570nm. Os valores obtidos das absorbâncias foram registrados em planilhas Excel.

### 3.2.6 LIVE/DEAD e Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM)

A quantificação de microrganismos vivos e mortos foi realizada através da análise da viabilidade bacteriana e visualização de imagens em CLSM. Após a exposição, as amostras de biofilmes revestidos por biofilme multiespécie foram enxaguados em solução DPBS, e corados utilizando o kit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability L7007 (BacLight™ bacterial viability kit, Molecular Probes, Oregon, USA)*. A coloração foi realizada utilizando os corantes SYTO 9 e iodeto de propídio, preparada conforme as instruções do fabricante. O corante SYTO 9 é visualmente de cor verde, representativo de microrganismos vivos, enquanto o iodeto de propídio é visualmente de cor vermelha, o qual representa microrganismos mortos. Durante a preparação foram utilizadas 3mL de água destilada estéril, com 9µl de SYTO 9 e 9µl

de iodeto de propídio. A solução foi depositada em 3 poços de uma placa, contendo 1mL em cada poço. Em seguida, as amostras de biofilmes foram transferidas para estes poços, no qual permaneceram por 15 minutos, protegidos de luz externa. Após este período em contato com os corantes, cada amostra foi lavada suavemente com DPBS para remoção de partículas residuais. As amostras de biofilmes corados foram montadas em lâminas de vidro para escaneamento e visualização das imagens em um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II; Leica Microsystems, Mannheim, Germany), com emissão de comprimento de onda entre 480–500nm para a coloração SYTO 9 e 490–635nm para o iodeto de propídio. As imagens dos biofilmes foram adquiridas pelo software Zen 2.3 (blue edition) e analisadas e quantificadas usando o software *Image J* (*ImageJ software, National Institutes of Health*). A eficácia antimicrobiana das soluções foi determinada a partir da seguinte fórmula: área de microrganismos vermelha / área total de microrganismo x 100.

### 3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de biofilmes cultivados com biofilme multiespécie destinados para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) passaram pelas seguintes etapas: fixação com solução *Karnovsky* (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 3% sacarose em tampão Cacodilato de Sódio) por 24 horas, em refrigeração, a fim de estabilizar e preservar a organização dos microrganismos. Após 24 horas imersas na solução, as amostras de biofilmes foram transferidas para uma placa de 12 poços contendo Tampão Cacodilato de Sódio trihidratado (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsNaO<sub>2</sub>). Em seguida, as amostras foram Pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio (OsO<sub>4</sub>) 2% na capela de fluxo laminar. As amostras de biofilmes foram mantidas 30 minutos nessa solução. Em seguida, as amostras foram desidratadas com acetona durante 10 minutos em cada uma das seguintes concentrações: 50%, 70%, 90% e 100%, sendo realizada por duas vezes a etapa na última concentração. A secagem final das amostras foi obtida no equipamento secagem ao ponto crítico (BalTec CPD 030, Balzers, Liechtenstein). As amostras passaram por processo de metalização para prover a condutividade da superfície das amostras, sistema conhecido como “*sputtering*”. As amostras de biofilmes foram montadas nos “*stubs*”, com fitas adesivas dupla face de carbono, ajustando-se a melhor orientação da amostra para a posição desejada. Uma cobertura fina de ouro de aproximadamente 10nm de espessura foi aplicada sobre as amostras,

as quais foram inseridas no microscópio JEOL (JSM-7001F, Akishima, Tokyo, Japan) para avaliação da presença de células sobre as amostras de biofilmes. As imagens dos biofilmes foram adquiridas pelo software JEOL *Serving Advanced Technology*, em aumentos de 3000x e 15000x.

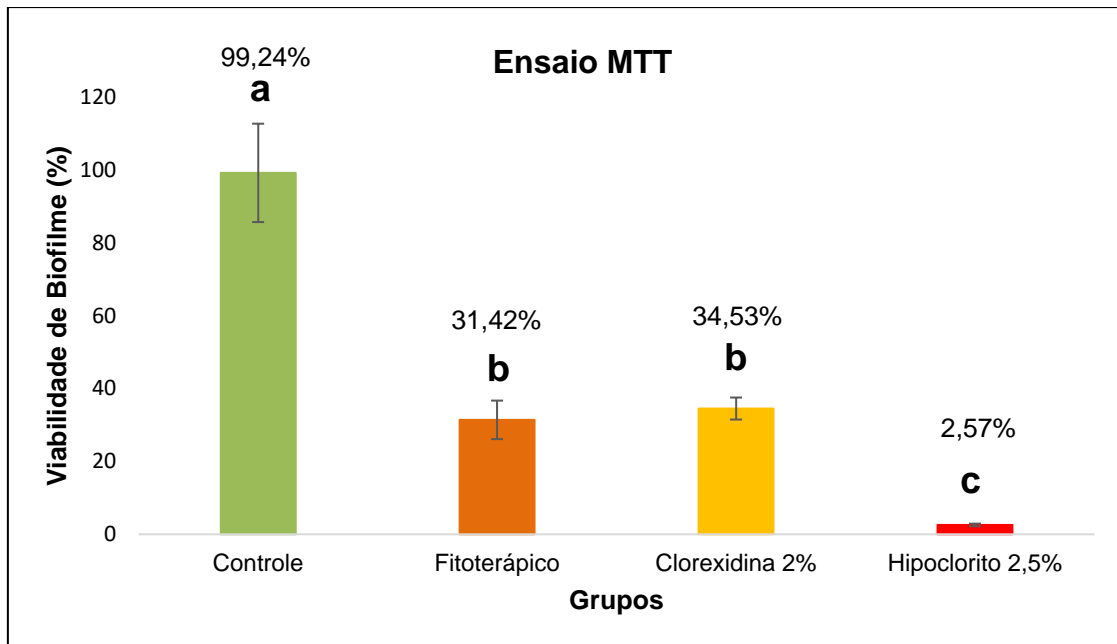
### 3.2.8 Análises Estatísticas

Os dados foram exportados para planilhas Excel (*Office 2007, Microsoft*) e as análises estatísticas foram realizadas no software Stata IC 17.0® (StataCorp, College Station, TX, USA). Inicialmente foi realizado cálculo amostral para determinação do  $n$ , no programa G\*Power (HHU, Düsseldorf, Alemanha), o  $n$  obtido foi 8. A fim de aumentar a força do estudo o  $n$  mínimo utilizado foi 15. Em seguida, o teste *Shapiro-Wilk* foi realizado para observar a normalidade dos dados. A fim de verificar a diferença entre grupos, em células bacterianas por biofilme, foi realizada a análise unidirecional de variância (ANOVA), e as diferenças intergrupos foram identificadas a partir de comparações múltiplas do teste de *tukey-Kramer*. A significância estatística foi fixada em um nível de confiança de 95% e o nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Ensaio MTT

O teste de normalidade *Shapiro-wilk* apresentou distribuição normal entre os dados de todos os grupos quanto à viabilidade microbiana calculada após o ensaio MTT. A análise unidirecional de variância (ANOVA) revelou diferenças estatisticamente significativas na média da quantidade de microrganismos viáveis após a exposição aos irrigantes testados ( $p = 0,000$ ,  $F = 330,8$ ) (imagem 1). O teste post-hoc de Tukey-Kramer demonstrou que o escore médio do grupo controle foi significativamente maior do que o dos demais grupos (99,24;  $\pm 13,50$ ), assim como o grupo CHX 2% (34,53;  $\pm 3,01$ ) e o grupo tratado com solução fitoterápica (31,42;  $\pm 5,28$ ), em comparação com o grupo NaOCl 2,5% (2,57;  $\pm 0,35$ ). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CHX 2% e solução fitoterápica ( $p = 0,98$ ).



**Figura 1** – Viabilidade de microrganismos após a exposição aos irrigantes e ensaio MTT. Letras minúsculas diferentes indicam presença de diferença estatística significativas ( $p < 0,05$ ). Grupo controle = amostras imersas em meio de cultura puro.

### 3.3.2 LIVE/DEAD e Imagens CLSM

O teste de normalidade *Shapiro-wilk* indicou que os dados de todos os grupos apresentaram distribuição normal quanto à atividade antimicrobiana calculada após experimento de LIVE/DEAD. A análise unidirecional de variância (ANOVA) revelou diferenças estatisticamente significativas na média da quantidade de microrganismos viáveis após a exposição aos irrigantes testados ( $p = 0,000$ ,  $F = 248,38$ ) (figura 2). O teste *post-hoc* de *Tukey-Kramer* mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos avaliados ( $p = 0,00$ ).

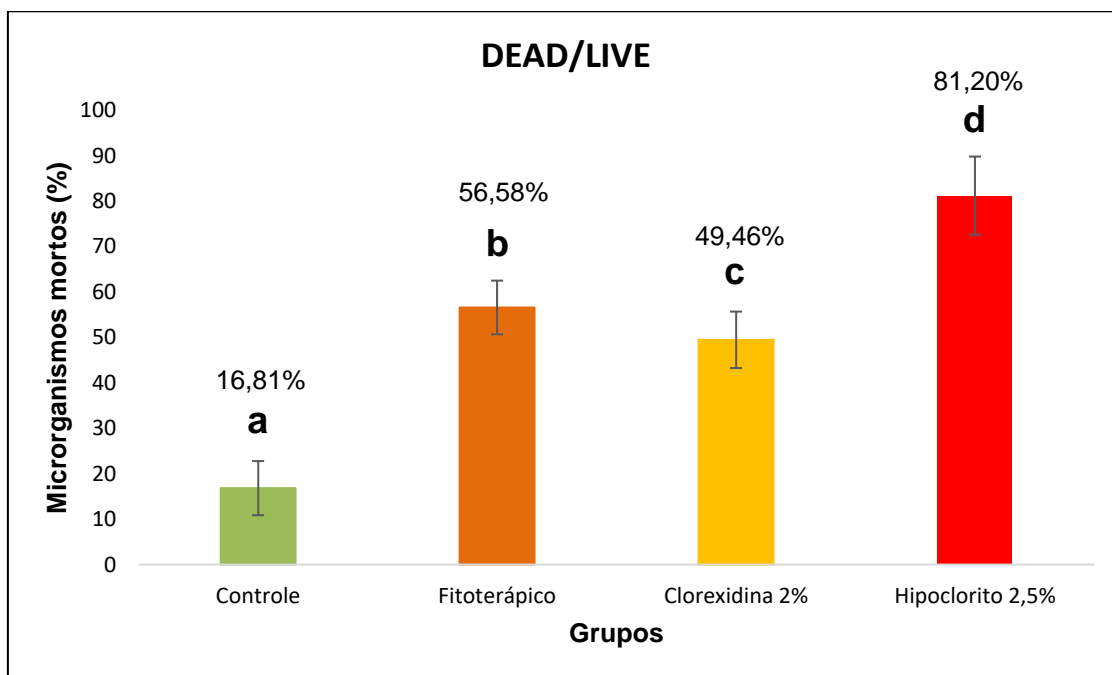
Imagens representativas das amostras de biofilme após tratamento são apresentados na figura 3. Nas amostras sem tratamento, imersas em meio de cultura puro, o biofilme se apresenta denso, com maior concentração de colônias verdes agrupadas e áreas mínimas vermelhas, representativas de microrganismos mortos (fig. 3A e 3B). O escore médio de atividade antimicrobiana do grupo controle foi significativamente menor comparado demais grupos ( $16,81$ ;  $\pm 5,95$ ) ( $p = 0,00$ ).

Nas amostras tratadas com solução fitoterápica, os microrganismos presentes no biofilme apresentaram maior quantidade de fluorescência vermelha em

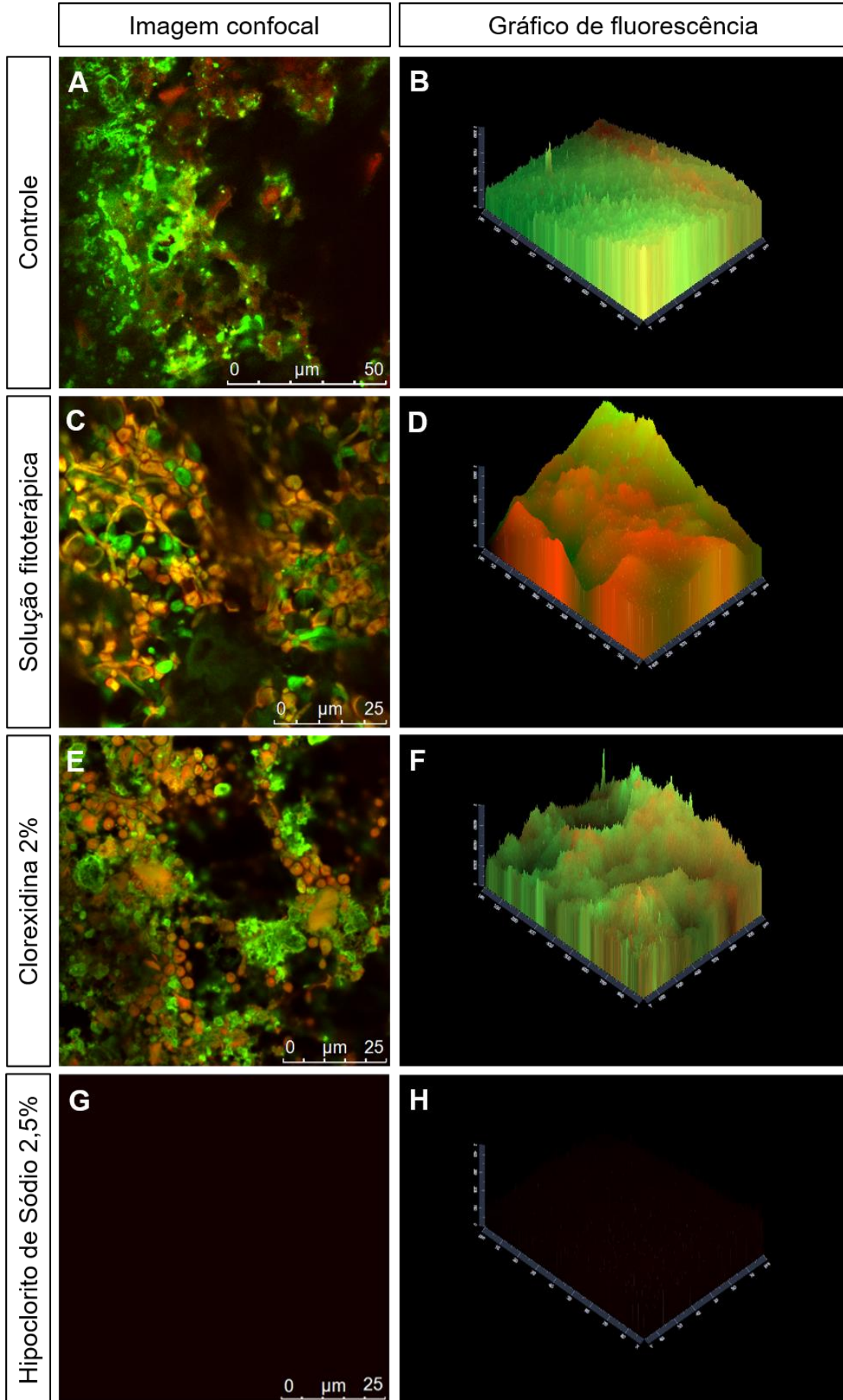
comparação com a área verde, além de exibirem grupamentos microbianos mais bem delimitados em comparação a massa de biofilme dos demais grupos (fig. 3C e 3D). Houve aumento significativo na atividade antimicrobiana ( $56,58; \pm 5,91$ ) ( $p = 0,00$ ).

O grupo de amostras imersas em solução de clorexidina a 2% apresentou menor atividade antimicrobiana em comparação com os biofilmes tratados com a solução fitoterápica ( $p = 0,02$ ) ( $49,46; \pm 6,21$ ). As imagens de microscopia confocal e o gráfico de fluorescência mostram áreas de biofilme denso com proporções semelhantes de verde e vermelho (fig. 3E e 3F).

A maior atividade antimicrobiana foi observada pelo biofilme tratado com hipoclorito de sódio a 2,5% ( $81,20; \pm 8,59$ ), sendo significativamente maior que os demais ( $p = 0,00$ ). A imagem de microscopia confocal mostra uma área de total dissolução, e o gráfico de fluorescência representa a área total sem microrganismos (fig. 3G e 3H).



**Figura 2** – Fluorescência vermelha, representativa de microrganismos mortos, após a exposição aos irrigantes e teste LIVE/DEAD. Letras minúsculas diferentes indicam presença de diferença estatística significativas ( $p < 0,05$ ). Grupo controle = amostras imersas em meio de cultura puro.



**Figura 3** – Microscopia confocal de biofilme múltiplo tratado com diferentes soluções irrigadoras endodônticas (verde: bactérias vivas; vermelho: bactérias mortas; preto: sem bactérias). (A) Imagem de microscopia confocal de biofilme multiespécie não tratado, imerso em meio de cultura puro, por 45 minutos em agitação. (B) Gráfico de fluorescência representativa da viabilidade microbiana de biofilme sem tratamento. (C) Imagem de microscopia confocal de biofilme multiespécie tratado com solução fitoterápica por 45 minutos em agitação. (D) Gráfico de fluorescência representativa da viabilidade microbiana de biofilme após tratamento com solução fitoterápica. (E) Imagem de microscopia confocal de biofilme multiespécie tratado com solução de clorexidina a 2% por 45 minutos em agitação. (F) Gráfico de fluorescência representativo da viabilidade microbiana de biofilme após tratamento com solução de clorexidina 2%. (G) Imagem de microscopia confocal de biofilme multiespécie tratado com hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 minutos em agitação. (H) Gráfico de fluorescência representativo da viabilidade microbiana de biofilme após tratamento com hipoclorito de sódio a 2,5%.

### 3.3.3 Imagens MEV

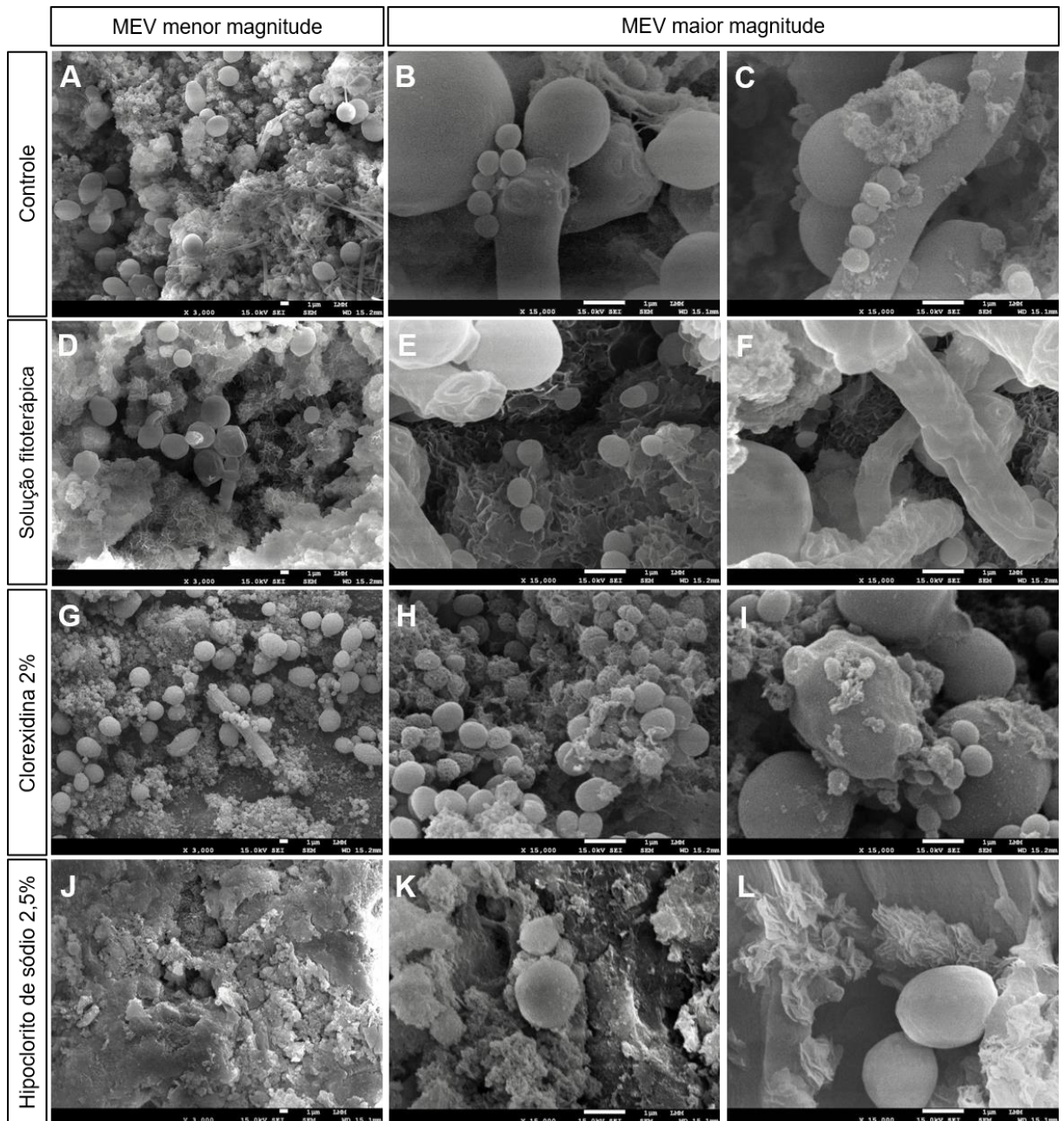
Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de biofilme após a imersão nas soluções irrigadoras de tratamento são mostradas na figura 4. A figura 4A exibe a superfície do substrato totalmente coberta por um espesso depósito de microrganismos aglomerados, representando o biofilme na ausência de tratamento. Há uma estrutura de microrganismos em múltiplas camadas, com a presença de cocos, leveduras e bastonetes. A figura 4B, em maior ampliação, evidencia a relação de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, além de mostrar a presença de matriz extracelular próximos aos microrganismos.

O tratamento com solução fitoterápica dissolveu parcialmente os biofilmes e expôs parte do substrato subjacente. Observam-se aglomerados microbianos em menor quantidade e sem a presença de matriz extracelular (fig. 4C). Em maior ampliação, são visíveis células bacterianas e fúngicas dispersas, com uma maior prevalência de *C. albicans* e a uma redução expressiva de *S. mutans*, e *P. auruginosa*, em comparação com o biofilme não tratado (fig. D). Ademais, é notável a irregularidade da superfície dos microrganismos, evidenciando um aspecto poroso e enrugado da membrana celular.

O biofilme exposto à clorexidina a 2% mantém o aspecto de aglomerados microbianos intactos, semelhante ao biofilme não tratado. Há dissolução parcial do biofilme, de modo a expor o substrato subjacente, entretanto, múltiplos aglomerados

de microrganismos se encontram organizados (fig. 4E). Em maior ampliação, observa-se em algumas células microbianas, pequenas partículas visíveis na superfície, resultantes da ruptura celular parcial, exceto nas células de *P. aeruginosa*, nos quais essas pequenas vesículas são mínimas. Além disso, é possível observar a grande quantidade de matriz extracelular envolvendo os microrganismos (fig. 4F).

Em contraste, as amostras tratadas com NaOCl 2,5% apresentam um substrato livre de microrganismos, com biofilme completamente dissolvido, evidenciado pela ausência de aglomerados bacterianos (fig. 4G). Em ampliação, observam-se pequenas quantidades de leveduras isoladas (fig. 4H).



**Figura 3** – Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme múltiplo com diferentes soluções irrigadoras. (A) Imagem MEV de biofilme multiespécie não tratado, imerso em meio de cultura puro, por 45 minutos em agitação; magnitude de 3.000x. (B e C) Ampliação de 15.000x de biofilme multiespécie não tratado. (D) Imagem MEV de biofilme multiespécie após tratamento com solução fitoterápica, por 45 minutos em agitação; magnitude de 3.000x. (E e F) Ampliação de 15.000x de biofilme multiespécie após tratamento com solução fitoterápica. (G) Imagem MEV de biofilme multiespécie após tratamento com solução de clorexidina a 2%, por 45 minutos em agitação; magnitude de 3.000x. (H e I) Ampliação de 15.000x de biofilme multiespécie após tratamento com solução de clorexidina a 2%. (J) Imagem MEV de biofilme multiespécie após tratamento com hipoclorito de sódio a 2,5%, por 5 minutos em agitação; magnitude de 3.000x. (K e L) Ampliação de 15.000x de biofilme multiespécie após tratamento com hipoclorito de sódio a 2,5%.

### 3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* foi conduzido a fim de investigar a eficácia antimicrobiana da associação dos óleos essenciais *Tea Tree* (*Melaleuca alternifolia*) e *Petitgrain* (*citrus aurantium*) como solução irrigadora do canal radicular em biofilme múltiplo, em comparação com hipoclorito de sódio 2,5% e solução de digluconato de clorexidina 2%. Os resultados obtidos refutam a hipótese nula inicialmente levantada e revelam que há diferença quanto a eficácia antimicrobiana entre as soluções testadas. Dentre os parâmetros analisados, observou-se maior efetividade na redução de microrganismos viáveis após a exposição do biofilme ao hipoclorito de sódio a 2,5%, seguido pela solução fitoterápica de óleos essenciais e, por fim, pela clorexidina a 2%.

O Hipoclorito de sódio 2,5% e a clorexidina 2% foram selecionadas como soluções irrigadoras comparativas à solução fitoterápica experimental devido ao seu uso predominante na prática clínica atual [3, 17, 18]. O presente estudo é inovador ao avaliar o efeito antimicrobiano da combinação dos óleos de *tea tree* e *petitgrain*, em especial contra *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *C. albicans*, organizados em biofilme múltiplo. Sua composição na forma de líquido foi preferida em comparação a mesma composição na forma de gel, visto que líquidos

possuem maior capacidade de adentrar em locais de difícil acesso no sistema de canais radiculares.

Os microrganismos selecionados para formar o biofilme múltiplo neste estudo foram *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Curiosamente, ao analisar a organização entre esses microrganismos observa-se uma relação de antagonismo entre *P. aeruginosa* e *C. albicans* [19]: as células de *P. aeruginosa* são capazes de suprimir as hifas da *Candida* enquanto mantêm a sobrevivência das leveduras, possivelmente devido à presença da toxina piocianina (PYO) que altera a parede celular de *C. albicans* [20]. Além disso, as células de *P. aeruginosa* aderem às superfícies das hifas de *C. albicans* na presença de moléculas de 3-oxo-HSL (*3-oxododecanoil-L-homoserina lactona*), que são mediadores do sistema de *quorum sensing Las* de *P. aeruginosa*, ademais, a quantidade crescente de 3-oxo-HSL está associada à inibição da transição de levedura para hifas de *C. albicans* [19]. Por outro lado, *C. albicans* inibe a motilidade de *P. aeruginosa*, impacta a produção de seus fatores de virulência e reduz seu crescimento em concentrações elevadas [21]. Além disso, *C. albicans* produz etanol que estimula a adesão e a formação de biofilme de *P. aeruginosa* [22]. Essas interações fundamentam a estratégia de formação de biofilme múltiplo com *C. albicans* precedendo *P. aeruginosa* neste estudo, e os resultados observados nas imagens de MEV confirmam a predominância de leveduras, em comparação às hifas fúngicas.

Neste artigo, observou-se uma redução expressiva de biofilme após tratamento com a solução fitoterápica experimental, especialmente na redução de *S. mutans*. Esses achados estão em consonância com estudo anterior, no qual o *petitgrain (citrus aurantium)* foi avaliado isoladamente quanto à sua efetividade antimicrobiana contra *S. mutans*, demonstrando inibição de crescimento do microrganismo em contato direto com baixa concentração do óleo essencial (0,3µg/mL). Enquanto em concentração mais alta (7µg/mL), o potencial antimicrobiano foi confirmado [14]. Tal efeito ocorre, possivelmente, devido a interação de limoneno e o linalol, presentes no óleo de *petitgrain*, com o *S. mutans*.

O óleo essencial de *petitgrain* é capaz de diminuir a expressão de mRNA dos genes *gftB*, *gftC*, *gfpB*, *comC*, *comD*, e *comE* em *S. mutans* [14]. Esses genes regulam as interações entre as células de *S. mutans* na formação do biofilme [23].

O gene *gftB* sintetiza polissacarídeos contendo glucanos ligados a  $\alpha$ -1,3, facilitando a agregação em biofilmes estáveis, enquanto o gene *gftC* codifica a proteína GTFC, envolvida na síntese de glucanos ligados a  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6 necessários para a formação e estabilização de biofilmes, e o gene *gpbB* está envolvido na agregação célula-célula bacteriana oral, contribuindo para a adesão bacteriana e a formação da estrutura dos biofilmes [24, 25]. Ademais, os genes *comC*, *comD* e *comE* codificam precursores do peptídeo estimulador de competência (CSP) que contribui para a formação de biofilme [23]. A diminuição desses genes, regulatórios de mecanismos cruciais na formação de biofilmes de *S. mutans*, podem explicar sua degradação significativa após a exposição a solução fitoterápica.

Outro achado relevante no presente estudo foi a alteração da membrana celular das bactérias após contato com a solução fitoterápica de óleos essenciais. A membrana celular atua como uma barreira de proteção para as atividades metabólicas. O óleo *tea tree* é lipofílico e possui compostos hidrofílicos de hidrocarboneto que prejudicam a capacidade estrutural e funcional da membrana celular, alterando a permeabilidade e induzindo a formação de poros na superfície dos microrganismos [12, 26]. O *terpinen-4-ol*, composto essencial do óleo *tea tree*, ao penetrar nas células bacterianas através das membranas citoplasmáticas causa pressão osmótica interna e a parede celular torna-se fraca, rompendo a membrana com subsequente perda do material citoplasmático. Consequentemente, há a inibição da atividade metabólica, ocasionando morte celular [26, 27]. Os resultados do presente estudo confirmam estudos anteriores que demonstram que as células bacterianas foram danificadas após tratamento com óleo *tea tree*, além de serem mais sensíveis ao óleo fitoterápico em comparação com *C. albicans* [12, 26, 28].

O sistema de canais radiculares proporciona um ambiente favorável para a proliferação de microrganismos e a formação de biofilmes que podem resistir à penetração e à ruptura por agentes antimicrobianos [5]. O biofilme após tratamento com clorexidina a 2% no presente estudo apresentou resistência à degradação. Tal fato se deve, possivelmente, pela reação das moléculas de CHX, carregadas positivamente, com a matriz extracelular carregada negativamente, essa reação causa colapso imediato dos polissacarídeos da matriz superficial,

resultando em uma pequena redução do volume do biofilme total [29]. Entende-se que as interações iônicas reduzem os coeficientes de difusão, proporcionando uma ação mais superficial [29, 30]. Esta reação iônica também ocorre na superfície celular, causando danos irreversíveis à membrana plasmática, coagulação de proteínas citoplasmáticas e inibição de enzimas, ocasionando, conseqüentemente, morte celular, sendo seu principal mecanismo antimicrobiano [29, 31].

O tratamento com clorexidina induz alterações morfológicas mais significativas em células microbianas sensíveis a CHX, enquanto células resistentes não exibem danos estruturais [32]. A *P. aeruginosa* possui um determinante de resistência à CHX que, possivelmente, justifica a ausência de danos estruturais após o uso de clorexidina a 2% neste estudo. Foi relatado que a *P. aeruginosa* possui um sistema de bombas de efluxo multidrogas, o MexCD-OprJ, que é regulado positivamente após exposição a concentrações subinibitórias de CHX [33]. Este sistema atua expulsando o agente antimicrobiano através de proteínas transmembrana formando canais para remoção de substâncias tóxicas do citoplasma e da membrana citoplasmática [32, 34].

O uso de soluções irrigadoras no canal radicular é essencial para o sucesso do tratamento endodôntico [17]. O estudo presente corrobora com pesquisa anterior ao demonstrar uma maior dissolução de biofilme múltiplo após o uso de hipoclorito de sódio [30]. Zhejun Wang, *et al.* (2020), avaliaram o potencial antimicrobiano do NaOCl em concentrações de 2% e 6% em um experimento de LIVE/DEAD, comparando-o com clorexidina a 2% em biofilme de placa dentária com 3 dias de maturação. Os resultados mostraram uma redução de 94% após 2 minutos de contato com NaOCl a 6%, e 99% em 32 minutos. Em comparação, no mesmo período, o NaOCl a 2% reduziu 90%, enquanto a CHX 2% reduziu 84% de microrganismos, evidenciando uma redução significativamente maior com NaOCl em relação à CHX. No presente experimento LIVE/DEAD, o hipoclorito de sódio a 2,5% demonstrou uma efetividade antimicrobiana de 81% em 5 minutos de contato com as amostras de biofilme, enquanto a clorexidina apresentou 49,5% após 45 minutos, conforme evidenciado na sessão de resultados. A diferença na porcentagem de efetividade antimicrobiana entre os resultados do presente estudo e o citado estudo de Zhejun Wang, *et al.* (2020) pode ser atribuída ao tipo de biofilme utilizado, na presente pesquisa foram utilizadas cepas de

microrganismos puros em biofilme de 7 dias de formação, enquanto Zhejun Wang , et al. (2020) utilizaram biofilmes da cavidade oral cultivados por 3 dias, sem seleção específica de microrganismos, o que pode ter favorecido uma maior ação antimicrobiana.

O período de exposição aos irrigantes neste estudo foi de 45 minutos, em agitação, a fim de refletir o tempo clínico médio necessário para realização do preparo biomecânico no tratamento endodôntico convencional. A metodologia utilizada considera que a solução irrigadora esteja em movimento, visto que na prática clínica esta não permanece estática dentro do conduto radicular. O hipoclorito de sódio, no entanto, permaneceu em contato com as amostras por apenas 5 minutos. Embora esse tempo seja inferior ao dos demais irrigantes, a observação é válida, visto que o NaOCl necessita ser renovado constantemente dentro do conduto durante o preparo químico-mecânico, uma vez que seu mecanismo de ação é decorrente do cloro livre disponível ao inibir enzimas bacterianas essenciais, entretanto, ao reagir quimicamente com biofilme, dentina e tecido pulpar, há um rápido consumo do cloro livre disponível, justificando sua constante renovação [35, 36].

Quanto as limitações do presente estudo, pode destacar a ausência de informações quanto à citotoxicidade e às propriedades físicas das substâncias testadas. A metodologia empregada verificou apenas a atividade antimicrobiana das soluções em condições experimentais. No entanto, mais estudos laboratoriais são necessários para verificar a segurança da solução fitoterápica testada, e os efeitos nas propriedade físico-químicas ocasionadas à dentina e, posteriormente, a realização de ensaios clínicos antes da indicação ampla para uso clínico.

Os resultados do presente estudo sugerem que a solução fitoterápica da associação de óleos essenciais de *tea tree* e *petitgrain* é uma alternativa promissora para uso na endodontia como irrigante no tratamento de canais radiculares.

### 3.5 CONCLUSÕES

A associação dos óleos essenciais de *tea tree* (*malaleuca alternifolia*) e *petitgrian* (*citrus aurantium*) se mostrou eficaz contra o biofilme múltiplo composto por *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, superior a clorexidina 2%, porém, com ação antimicrobiana foi inferior ao NaOCl 2,5%. Mais estudos são necessários para verificar a citotoxicidade e as propriedades físicas da solução em tecidos biológicos e na estrutura dental, além de aprofundar o conhecimento quanto aos mecanismos de ação antimicrobiana da solução. A busca por soluções irrigadoras que visem eficácia antimicrobiana aliada a biocompatibilidade ainda é imprescindível no campo da endodontia nos dias atuais.

### 3.6 REFERÊNCIAS

1. Zehnder, M., *Root canal irrigants*. J Endod, 2006. **32**(5): p. 389-98.
2. Ørstavik, D., V. Qvist, and K. Stoltze, *A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(3): p. 224-30.
3. Boutsoukis, C., M.T. Arias-Moliz, and L.E. Chávez de Paz, *A critical analysis of research methods and experimental models to study irrigants and irrigation systems*. Int Endod J, 2022. **55 Suppl 2**(Suppl 2): p. 295-329.
4. Peters, O.A., *Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review*. J Endod, 2004. **30**(8): p. 559-67.
5. Ricucci, D. and J.F. Siqueira, Jr., *Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings*. J Endod, 2010. **36**(8): p. 1277-88.
6. Flemming, H.C., et al., *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(9): p. 563-75.

7. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
8. Ruksakiet, K., et al., *Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials*. J Endod, 2020. **46**(8): p. 1032-1041.e7.
9. Agrawal, V., S. Kapoor, and I. Agrawal, *Critical Review on Eliminating Endodontic Dental Infections Using Herbal Products*. J Diet Suppl, 2017. **14**(2): p. 229-240.
10. Reddy, V., et al., *Effectiveness of tea tree oil and chlorhexidine as mouth rinse in the control of dental plaque and chronic gingivitis-A comparative study*. Eur. J. Mol. Clin. Med, 2020. **7**(8): p. 1576-1582.
11. Kamath, N.P., et al., *The effect of aloe vera and tea tree oil mouthwashes on the oral health of school children*. European Archives of Paediatric Dentistry, 2020. **21**: p. 61-66.
12. Li, W.R., et al., *The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. **100**(20): p. 8865-75.
13. Halcón, L. and K. Milkus, *Staphylococcus aureus and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial*. Am J Infect Control, 2004. **32**(7): p. 402-8.
14. Benzaid, C., et al., *Effect of Citrus aurantium L. Essential Oil on Streptococcus mutans Growth, Biofilm Formation and Virulent Genes Expression*. Antibiotics (Basel), 2021. **10**(1).

15. Krithikadatta, J., V. Gopikrishna, and M. Datta, *CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research*. J Conserv Dent, 2014. **17**(4): p. 301-4.
16. Darrag, A.M., *Antimicrobial efficacy of endodontic irrigation solutions against planktonic microorganisms and dual-species biofilm*. Tanta Dental Journal, 2013. **10**: p. 129–137.
17. Haapasalo, M., et al., *Irrigation in endodontics*. Br Dent J, 2014. **216**(6): p. 299-303.
18. Boutsoukis, C. and M.T. Arias-Moliz, *Present status and future directions - irrigants and irrigation methods*. Int Endod J, 2022. **55 Suppl 3**(Suppl 3): p. 588-612.
19. Fourie, R., et al., *Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa Interaction, with Focus on the Role of Eicosanoids*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 64.
20. Brand, A., et al., *Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **287**(1): p. 48-55.
21. Kahl, L.J., et al., *Interkingdom interactions between Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans affect clinical outcomes and antimicrobial responses*. Curr Opin Microbiol, 2023. **75**: p. 102368.
22. Chen, A.I., et al., *Candida albicans ethanol stimulates Pseudomonas aeruginosa WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004480.
23. Lemos, J.A., et al., *The Biology of Streptococcus mutans*. Microbiol Spectr, 2019. **7**(1).

24. Veloz, J.J., et al., *Polyphenol-Rich Extract from Propolis Reduces the Expression and Activity of Streptococcus mutans Glucosyltransferases at Subinhibitory Concentrations*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 4302706.
25. Duque, C., et al., *Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of Streptococcus mutans*. Infect Immun, 2011. **79**(2): p. 786-96.
26. Brun, P., et al., *In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (Melaleuca alternifolia) Essential Oils*. Curr Microbiol, 2019. **76**(1): p. 108-116.
27. Bordini, E.A.F., et al., *Antimicrobial effects of terpinen-4-ol against oral pathogens and its capacity for the modulation of gene expression*. Biofouling, 2018. **34**(7): p. 815-825.
28. Qi, J., et al., *Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on Enterococcus faecalis and biofilm in vitro*. J Ethnopharmacol, 2021. **281**: p. 114566.
29. Shen, Y., S. Stojicic, and M. Haapasalo, *Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development*. J Endod, 2011. **37**(5): p. 657-61.
30. Wang, Z., Y. Shen, and M. Haapasalo, *Dynamics of Dissolution, Killing, and Inhibition of Dental Plaque Biofilm*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 964.
31. Bernardi, A. and C.S. Teixeira, *The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics*. Quintessence Int, 2015. **46**(7): p. 575-82.
32. Cieplik, F., et al., *Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern?* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 587.

33. Morita, Y., J. Tomida, and Y. Kawamura, *Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials*. Front Microbiol, 2014. **4**: p. 422.
34. Lorusso, A.B., et al., *Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(24).
35. Estrela, C., et al., *Mechanism of action of sodium hypochlorite*. Braz Dent J, 2002. **13**(2): p. 113-7.
36. Macedo, R.G., et al., *Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH*. Int Endod J, 2010. **43**(12): p. 1108-15.

## 4. CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL

### 4.1 DISCUSSÃO GERAL

Diversos estudos publicaram dados consistentes a cerca do potencial uso de extratos de plantas na composição de soluções irrigadoras na endodontia. A revisão narrativa do presente estudo demonstrou que existe uma gama de fitoterápicos sendo avaliados para uso nos procedimentos clínicos e que grande parte apresenta eficácia semelhante ou superior a produtos sintéticos tradicionalmente já utilizados. Em relação às soluções irrigadoras, a eficácia antimicrobiana ainda é relativamente inferior ao hipoclorito de sódio (NaOCl) nos estudos analisados, entretanto, deve-se levar em conta os efeitos negativos do NaOCl, que até o momento não foram constatadas em soluções fitoterápicas.

No estudo *in vitro* desta dissertação o NaOCl a 2,5% apresentou maior ação antimicrobiana seguida da solução fitoterápica composta pelos óleos essenciais de *tea tree* e *petitgrain*, e por fim pela clorexidina (CHX) a 2%. A diferença estatística entre a solução fitoterápica e CHX 2% não foi significativa após o ensaio MTT. No entanto, em experimento LIVE/DEAD a morte de microrganismos foi significativamente maior após o uso da solução irrigadora fitoterápica quando comparado a CHX 2%, e o padrão de biofilme se apresenta menos denso nas imagens de microscopia confocal, comparado ao biofilme após tratamento com CHX. Além disso, a microscopia de varredura evidencia a menor densidade de microrganismos agrupados em biofilme pós uso de solução fitoterápica, em relação à CHX 2%. Sabe-se que a CHX apresenta uma ação mais superficial no biofilme devido as interações iônicas com a matriz extracelular, dificultando a penetração em camadas mais profundas, o que justifica a permanência de mais microrganismos agrupados. Nesse sentido, os compostos fitoterápicos da solução de estudo obtêm vantagem, visto que a ação do *petitgrain* é direcionada para a diminuição de genes que controlam a agregação das bactérias em biofilme e o *tea tree* atua na diretamente na superfície dos microrganismos promovendo o rompimento das membranas citoplasmáticas, e a consequente morte celular. O resultado em conjunto dos experimentos realizados neste estudo demonstra a eficácia da solução irrigadora experimental à base da associação dos óleos essenciais *tea tree* e *petitgrain*.

Outro ponto relevante se de considerar é que não há relatos na literatura acerca de mecanismos de resistência microbiana em relação às soluções fitoterápicas. Diferentemente da solução de clorexidina, em que são descritos métodos de bombas de efluxo presentes nas membranas de *Pseudomonas* para expulsão da solução. Este é um ponto positivo em relação aos fitoterápicos, mas que também merece maiores investigações, visto a crescente taxa de resistência antimicrobiana a diversas formulações atuais.

Para que os dados acerca desta dissertação se tornem mais conclusivos, são necessários que mais estudos envolvendo os fitoterápicos em questão sejam realizados em biofilme múltiplo, possivelmente abordando estes e mais microrganismos relevantes nas doenças endodônticas, e em diferentes estágios de formação, a fim de se obter um panorama geral dos mecanismos de ação das formulações. E partir disso, possa haver informações suficientes, e padronizadas, para futuras revisões sistemáticas da literatura.

## 4.2 CONCLUSÕES

Em suma, os resultados obtidos nesta dissertação evidenciam que soluções irrigadoras à base de extrato de plantas são promissoras para uso na endodontia. No entanto, mais estudos *in vitro* confirmatórios, e posteriormente, estudos clínicos, são necessários para validar a eficácia antimicrobiana e verificar o potencial citotóxico e os efeitos físicos destas soluções. A associação dos óleos de *tea tree* e *petitgrain* foram eficazes contra bactérias organizadas em biofilme múltiplo e apresentam potencial para uso como solução irrigadora no tratamento endodôntico.

## 5 CAPÍTULO 5 – PRESS RELEASE

O tratamento de canal radicular, necessário de ser realizado quando ocorrem doenças irreversíveis na polpa do dente ou quando há o comprometimento dos tecidos ao redor da raiz dentária, tem o objetivo de eliminar a infecção e prevenir novas infecções. Para alcançar este objetivo, soluções irrigadoras, capazes de matar microrganismos são utilizadas durante o tratamento. Essas soluções precisam ser potentes o suficiente para matar os microrganismos que estão dentro do dente, mas suaves o bastante para não causar irritações ou maiores complicações. As soluções irrigadoras comumente utilizadas no tratamento de canal apresentam algumas desvantagens em relação a ação nos tecidos do dente e ao redor, bem como na remoção dos microrganismos dos canais. Por este motivo, novas soluções irrigadoras estão constantemente sendo avaliadas. Neste contexto, soluções à base de extrato de plantas têm sido investigadas. O primeiro artigo desta dissertação revisou estudos sobre diversas formulações a base de plantas testadas para uso em procedimentos endodônticos, revelando uma gama de produtos fitoterápicos com potencial para substituir os produtos sintéticos atualmente utilizados. No segundo artigo, uma solução fitoterápica experimental, associando os óleos de *tea tree* e *petitgrain*, que possuem características de atividade antimicrobiana e biocompatibilidade, foi avaliada contra importantes microrganismos reunidos, presentes nas doenças endodônticas. Os resultados demonstraram que a solução experimental apresentou significativa ação antimicrobiana. Revelando que esta solução à base dos óleos essenciais pode ser futuramente utilizada como solução irrigadora durante o tratamento de canal radicular.