



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ADEILTON FÉLIX DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA SOLUÇÃO IRRIGADORA DE CANAIS
RADICULARES UTILIZANDO O EXTRATO DE PLANTAS MEDICINAIS DO
SEMIÁRIDO**

**CAMPINA GRANDE - PB
2018**

ADEILTON FÉLIX DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA SOLUÇÃO IRRIGADORA DE CANAIS
RADICULARES UTILIZANDO O EXTRATO DE PLANTAS MEDICINAIS DO
SEMIÁRIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Dantas de Medeiros.

CAMPINA GRANDE - PB
2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586d Silva, Adeilton Félix da.
Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de plantas medicinais do semiárido [manuscrito] / Adeilton Félix da Silva. - 2018.
71 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Profa. Dra. Ana Claudia Dantas de Medeiros, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Plantas medicinais. 2. Endodontia. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Semiárido Nordeste. 5. *Ximenia americana* L. 6. *Enterococcus faecalis*. I. Título

21. ed. CDD 615.321

ADEILTON FÉLIX DA SILVA

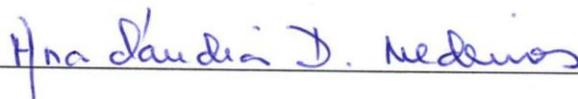
**DESENVOLVIMENTO DE UMA SOLUÇÃO IRRIGADORA DE CANAIS
RADICULARES UTILIZANDO O EXTRATO DE PLANTAS MEDICINAIS DO
SEMIÁRIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

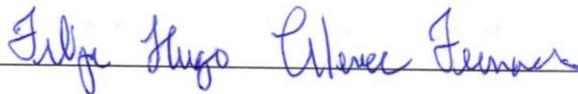
Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovado em: 02 / 10 / 2018

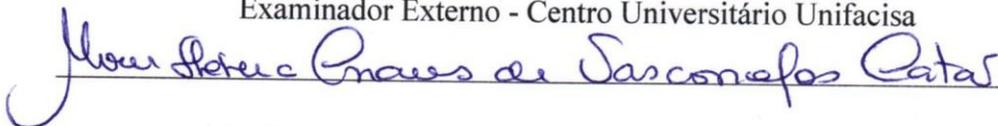
Banca examinadora



Profa. Dra. Ana Claudia Dantas de Medeiros
Orientadora – Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes
Examinador Externo - Centro Universitário Unifacisa



Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
Examinadora interna – Universidade Estadual da Paraíba

Dedico este trabalho à **Alexandra Asanovna Elbakyan** e a todos aqueles que acreditam no conhecimento livre e acessível a todos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia em nome de todos os professores e funcionários que fazem parte deste programa pela contribuição para minha formação acadêmica e científica.

À orientadora Ana Cláudia Dantas de Medeiros pela orientação e condução deste trabalho, sem os quais não seria possível realizá-lo.

Aos professores doutores Yuri Wanderley e a Jozinete Pereira pelas contribuições valiosas na melhoria do projeto de pesquisa que resultou neste trabalho.

Aos meus colegas de turma e em especial à Girdelânia Medeiros e Waleska Ohana pelo apoio nos momentos de dificuldade.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuição.

E a todos que participam do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM). Em especial a Angélica pela condução das análises microbiológicas; ao Doutor Felipe H. A. Fernandes, pelo desenvolvimento da formulação; ao Mestrando Lucas Almeida pelas análises fitoquímicas e a Widson pela contribuição na análise térmica. Sem a ajuda de todos, este trabalho não teria sido concluído.

Despite the relatively
high predictability of endodontic treatment outcome,
complete bacterial eradication is still impossible...”

Vincent Aw, 2016.

SILVA, A.F. Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de plantas medicinais de semiárido. 71p.:il colorido. 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campina Grande, 2018.

RESUMO

As plantas medicinais são importantes fontes de busca por novos agentes terapêuticos no combate às infecções ou com atividades biológicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma solução irrigadora de canais radiculares, com atividade antimicrobiana, utilizando-se plantas tradicionalmente utilizadas por populações, presentes no semiárido Brasileiro. Na bioprospecção foram utilizadas as plantas: *Ximenia americana* L., *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz, *Croton blanchetianus* Baill, *Schinopsis brasiliensis* L. e *Momordica charantia* L. Foram preparados extratos hidroalcoólicos nas concentrações (v/v) de 50, 70 e 90% e pelos métodos extrativos de ultrassom, turbólise e maceração de todas as plantas. Na determinação da atividade antimicrobiana destes extratos foi utilizado o método de microdiluição em caldo, através da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida e bactericida mínima (CFM/CBM), com cepas padronizadas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 11006). Na prospecção fitoquímica, determinou-se o teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados através de espectrofotometria por ultravioleta. O composto químico majoritário foi identificado através da cromatografia líquida de alta eficiência e foi realizado a caracterização físico-química da formulação. Enquanto na caracterização térmica foram traçados os perfis térmicos do extrato e dos excipientes utilizados no preparo da formulação intracanal desenvolvida. As plantas que apresentaram melhores atividades antimicrobianas para os microrganismos testados foram *Ximenia americana* L., *Schinopsis brasiliensis* L. e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. A planta escolhida para desenvolvimento da formulação intracanal foi *Ximenia americana* L., por apresentar melhor atividade antimicrobiana (7,8 a 125 µg/mL). Também foi determinada o teor de polifenóis totais (385,52 ± 15,90), flavonoides totais (14,79 ± 0,70) e taninos condensados (217,30 ± 5,22) desta planta. Em seguida foram feitos novos testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da formulação produzida, a fim de verificar interferências dos excipientes na atividade final da solução desenvolvida, o que não mostrou interferência da atividade antimicrobiana. O composto químico majoritário identificado foi o ácido gálico. Assim as plantas medicinais são uma alternativa na bioprospecção de antimicrobianos. Entretanto são necessários mais estudos para se determinar a efetividade desta solução *in vivo*. Estudos *ex vivo* são os próximos passos para uma futura aplicação clínica deste produto em condições específicas de necessidade clínica.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Endodontia. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Atividade antimicrobiana. Semiárido Nordeste. *Ximenia americana* L.

SILVA, A.F. Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de plantas medicinais do semiárido. 71p.il.il colorido. 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campina Grande, 2018.

ABSTRACT

Medicinal plants are important sources of search for new therapeutic agents in the fight against infections or with biological activities. The objective of this work was to develop an irrigation solution of root canals, with antimicrobial activity, using plants traditionally used by populations, present in the Brazilian semi-arid region. The plants were: *Ximenia americana* L., *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz, *Croton blanchetianus* Baill, *Schinopsis brasiliensis* L. and *Momordica charantia* L. Hydroalcoholic extracts were prepared in concentrations (v / v) of 50, 70 and 90% and by the extractive methods of ultrasound, turbolysis and maceration. In the determination of the antimicrobial activity of these extracts, the broth microdilution method was used through minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal and bactericidal concentration (MFC / MBC) with standard strains of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and *Candida albicans* (ATCC 11006). In the phytochemical prospection, the content of total polyphenols, total flavonoids and tannins condensed by ultraviolet spectrophotometry was determined. The major chemical compound was identified through high performance liquid chromatography and the physicochemical characterization of the formulation was performed. While in the thermal characterization the thermal profiles of the extract and the excipients used in the preparation of the developed intracanal formulation were drawn. The plants that presented the best antimicrobial activities for the microorganisms tested were: *Ximenia americana* L., *Schinopsis brasiliensis* L. and *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. The plant chosen to develop the intracanal formulation was *Ximenia americana* L., because it had better antimicrobial activity (7.8 to 125 µg / mL). The content of total polyphenols (385.52 ± 15.90), total flavonoids (14.79 ± 0.70) and condensed tannins (217.30 ± 5.22) of this plant were also determined. Further tests were carried out to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the formulation produced in order to verify interferences of the excipients in the final activity of the developed solution, which did not show interference of the antimicrobial activity. The major chemical compound was gallic acid. Thus medicinal plants are an alternative in the bioprospecting of antimicrobials. However, further studies are needed to determine the effectiveness of this solution *in vivo*. *Ex vivo* studies are the next steps for a future clinical application of this product under specific conditions of clinical need.

Keywords: Medicinal plants. Endodontics. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Antimicrobial activity. Northeastern semi-arid. *Ximenia americana* L.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
Cm ³	Centímetro cúbico
° C	Graus Celsius
DTA	Análise Térmica Diferencial (do inglês <i>differential thermal analysis</i>)
g	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
ΔH	Variação de temperatura
J	Joule
LABDEM	Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamento
mg	miligrama
mL	Mililitro
MTAD	Mistura de doxiciclina, ácido cítrico e detergente
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
nm	Nanômetro
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
p.f.	Ponto de fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotos da espécie <i>Ximenia americana</i> L.....	23
Figura 2: Vista panorâmica da <i>Croton blanchetianus</i> Baill.....	24
Figura 3: <i>Poincianella pyramidalis</i> : a espécie no meio ambiente.....	25
Figura 4: Características de <i>Momordica charantia</i>	26
Figura 5: <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler.: folhas e flores.....	27
Figura 6: Fluxograma das etapas da metodologia realizada.....	29
Artigo - Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de <i>Ximenia americana</i> L.	38
Figura 1: Cromatograma (HPLC/UV) da formulação com <i>Ximenia americana</i> L. (A) e ácido gálico (B).....	51
Figura 2: Curvas DTA do extrato de <i>Ximenia americana</i> L. e excipientes da formulação.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Plantas selecionadas para este trabalho.....	30
Tabela 2: Formulação da solução intracanal desenvolvida.....	32
Artigo - Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de <i>Ximenia americana</i> L.	
Tabela 1: Plantas selecionadas para este estudo.....	40
Tabela 2: Formulação da solução intracanal desenvolvida.....	42
Tabela 3: Avaliação da atividade antifúngica dos extratos frente às cepas de <i>Candida albicans</i> . Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$).....	48
Tabela 4: Avaliação da atividade bacteriana dos extratos frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> . Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$).....	49
Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da formulação de <i>Ximenia americana</i> L. (casca) e dos produtos comerciais para <i>Candida albicans</i>	50
Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da formulação de <i>Ximenia americana</i> L. (casca) e dos produtos comerciais para <i>Enterococcus faecalis</i>	50
Tabela 7: Teor de metabólitos secundários presentes no extrato da casca de <i>Ximenia americana</i> L. obtidos por espectroscopia em região visível.....	51
Tabela 8: Análise comparativa dos valores de pH, densidade (g/cm^3) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) das soluções testadas.....	52
Tabela 9: Dados de DTA referentes à etapas de decomposição de <i>X. americana</i> L. (A), Metilparabeno (B), Laurilsulfato de sódio (C), Solução irrigadora sem extrato vegetal (D), Solução irrigadora com extrato vegetal (E).....	55

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
1.1 Necrose pulpar e tratamento	14
1.2 Infecção endodôntica e composição bacteriana	15
1.3 Soluções irrigadoras de canais radiculares disponíveis no mercado	18
1.4 Plantas medicinais e sua atividade antimicrobiana na Odontologia	19
1.5 Plantas medicinais utilizadas neste estudo	23
<u>1.5.1 <i>Ximenia americana</i> L. (Ameixa)</u>	24
<u>1.5.2 <i>Cronton blanchetianus</i> Baill (Marmeleiro)</u>	25
<u>1.5.3 <i>Poincianella pyramidalis</i> (Catingueira)</u>	26
1.5.4 <i>Momordica charantia</i> (Melão de São Caetano).....	25
1.5.5 <i>Schinopsis brasiliensis</i> engl. (Braúna).....	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Tipo de estudo	31
3.2 Local da pesquisa	31
3.3 Material vegetal	31
3.4 Obtenção dos extratos	32
3.5 Caracterização da atividade antimicrobiana	32
<u>3.5.1 Cepas</u>	32
<u>3.5.2 Meios de cultura</u>	33
<u>3.5.3 Preparação da suspensão microbiana</u>	33
<u>3.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de Microdiluição</u> .	33
<u>3.5.5 Solução irrigadora</u>	34
<u>3.5.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução intracanal</u>	35
<u>3.5.7 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)</u>	35
3.6 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da solução desenvolvida	35
3.7 Prospeção fitoquímica	36

___ 3.7.1	Quantificação espectrofotométrica de flavonoides.....	36
___ 3.7.2	Quantificação espectrofotométrica de polifenóis	36
3.7.3	Quantificação espectrofotométrica de taninos.....	36
3.8	Determinação do marcador fitoquímico.....	37
3.9	Caracterização térmica do extrato e excipientes	37
4	RESULTADOS	38
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A endodontia é a especialidade odontológica que estuda a etiologia, prevenção e tratamento das alterações patológicas da polpa dentária e região apical e periapical (LEONARDO, 2008), tendo como objetivo o tratamento de lesões endodônticas para permitir a eliminação do maior número possível de agentes infecciosos (desinfecção), em caso de necrose pulpar. Uma vez que a eliminação total desses microrganismos é impossível nas condições do organismo humano (boca e sistema de canais radiculares) (AW, 2016; MACHADO, 2009).

Todavia, por meio do preparo biomecânico que se promoverá a limpeza dos canais e logo depois, a vedação hermética prevenirá a reinfecção e promoverá a cicatrização dos tecidos circundantes (BASRANIA; HAAPASALO, 2012). Apesar da instrumentação dos canais radiculares reduzir significativamente o número de microrganismos presentes nos canais, não há diferença significativa entre as técnicas de preparação dos canais pela técnica de instrumentação usada, seja manual (tipo K) ou rotatória (Protaper Universal) (NAKAMURA et al., 2013).

A eficácia das limas endodônticas, instrumentação rotatória, soluções de irrigação e agentes quelantes para limpar, moldar, e desinfetar canais radiculares propicia o sucesso, a longevidade, e confiabilidade dos modernos tratamentos endodônticos. As chances de um resultado favorável com tratamento de canal são significativamente maiores se a infecção é erradicada eficazmente antes do sistema de canais serem obturados (JAJU; JAJU, 2011).

Assim, a erradicação da infecção por meio do preparo biomecânico representa o maior desafio no tratamento endodôntico (ALMEIDA et al., 2018). Todavia, a variação da solução irrigadora utilizada desempenha um papel importante na descontaminação dos canais radiculares, devido sua ação antimicrobiana e capacidade de auxiliar a remoção de detritos e restos necróticos durante a instrumentação (NAKAMURA et al., 2013). O tratamento de sistemas de canais infectados pode não ser capaz de remover todas as bactérias e, portanto, a persistência bacteriana após o tratamento pode ocorrer.

Os agentes irrigantes endodônticos comumente utilizados são o hipoclorito de sódio (NaOCl), e o gluconato de clorexidina (PRETEL et al., 2011) e também o MTAD (mistura de doxiciclina, ácido cítrico e um detergente - Tween 80) (BORZINI et al., 2016). Mas até o momento não existe um produto que cumpra todos os requisitos necessários para um irrigante ideal, ou seja, possuir atividade antimicrobiana, não ser tóxico aos tecidos periapicais, inativar toxinas bacterianas e ser quelante dos tecidos dos canais radiculares. Há irrigantes

endodônticos que apresentam boa atividade antimicrobiana, porém podem resultar em toxicidade; outros dissolvem a camada de esfregaço, mas não desinfetam eficientemente o sistema de canais (BORZINI et al., 2016).

Assim, os irrigantes endodônticos atualmente disponíveis apresentam vantagens e limitações em suas propriedades, como por exemplo, o hipoclorito de sódio pode diminuir, aumentar ou não afetar a resistência de ligação entre restauração e dente, dependendo do tipo de sistema adesivo. Enquanto, a clorexidina e MTAD podem melhorar significativamente a estabilidade do adesivo-resina-dentina, apesar da pouca eficiência na dissolução de restos necróticos (MOHAMMADI et al., 2017).

As pesquisas com plantas medicinais vêm demonstrando propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória e antioxidante, o que pode ser relevante para uma aplicação clínica (JAIN e RANJAN, 2014; OLIVEIRA et al., 2016; TEWARI et al., 2016). Assim os estudos têm voltado sua atenção em plantas e seus derivados que apresentam atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* (considerado o principal patógeno de infecções endodônticas persistentes) e presente em até 97,5% de infecção endodônticas refratárias (HENRIQUES et al., 2016).

Portanto, pode-se, supor que alguns dos compostos bioativos presentes em plantas medicinais podem ser uma alternativa potencial ao NaOCl para o tratamento de canais ou como coadjuvante nas soluções existentes. Desse modo, o interesse em produtos naturais para uso odontológico para combate a diversas doenças tem aumentado independentemente se eles estão associados a outras terapias ou não (FREIRES E ROSALEN, 2016; SARDI et al., 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma solução irrigadora intracanal radicular com atividade antimicrobiana.

1.1 Necrose pulpar e tratamento

A polpa, diante de um fator agressor, apresenta reações inflamatórias ou degenerativas. Estas reações dependem do tipo, da frequência e da intensidade do agente irritante, assim como da resposta imune do paciente. Se o agente agressor não for removido, a polpa alterada sofrerá calcificação ou necrose. Quando uma alteração pulpar está presente e não é tratada, poderá evoluir para a necrose pulpar. A necrose consiste na completa cessação dos processos metabólicos do tecido pulpar e, se não for removida, os produtos tóxicos bacterianos e da decomposição tecidual vão agredir os tecidos periapicais, dando início às

alterações inflamatórias e necróticas nessa região (LEONARDI et al., 2011), sendo os biofilmes responsáveis por pelo menos 70% das doenças endodônticas (SHIN et al., 2018).

O profissional deve ter conhecimento sobre as características histológicas, clínicas e radiográficas dessas patologias para poder reconhecê-las e indicar a melhor opção de tratamento (LEONARDI et al., 2011). Há divergência quanto à classificação das patologias pulpares e periapicais, devido a esta classificação ser baseada em critérios histológicos, o que nem sempre tem correlação com o exame clínico. Além disso, o exame histopatológico não tem aplicabilidade clínica porque os tratamentos das patologias pulpares devem se seguir imediatamente ao exame clínico. Ainda, cada condição de doença pode progredir para outras condições se não for tratada, ou seja, tem caráter progressivo (ABBOTT, YU, 2007).

Vários agentes externos podem atuar como agressores à polpa e tecidos adjacentes. Como a presença de microrganismos é a principal causa de doenças da polpa, parte essencial do diagnóstico e da avaliação do dente é identificar como as bactérias entraram no dente e no espaço da polpa (ABBOTT, YU, 2007). Qualquer método de preparo biomecânico pode reduzir em até 98% os microrganismos do lúmen do canal radicular (NAKAMURA et al., 2013). Mas a persistência dos microrganismos nos túbulos dentinários implica na importância do desenvolvimento de soluções irrigadoras de canais com ação neste meio.

A finalidade da irrigação dos canais radiculares são dissolver os tecidos vitais ou necróticos da polpa, destruir os biofilmes endodônticos, neutralizar as endotoxinas e remover a *smear layer*. A atividade antimicrobiana e a destruição do biofilme parecem ser os objetivos mais importantes direcionados à etiologia das infecções pulpares e perirradiculares (NEELAKANTAN et al., 2017).

A terapia endodôntica é primariamente um problema infeccioso. Isso significa que o primeiro foco do tratamento é remediar a infecção dos canais para que o dente possa ser mantido por longo tempo sem causar doença inflamatória ou efeitos adversos na saúde sistêmica (BERGENHOLTZ, 2016). O resultado favorável da terapia dos canais radiculares não é uma questão apenas das técnicas de instrumentação empregadas.

1.2 Infecção endodôntica e composição bacteriana

A cavidade bucal abriga uma ampla variedade de microrganismos pertencentes a vários gêneros e filos com variação dos tipos e quantidades bacterianas, dependendo das condições locais de higiene e físico-químicas da saliva (BELSTRØM et al., 2017; PEREIRA et al., 2012). O gênero *Streptococcus* parece desempenhar um importante papel no surgimento e progressão da cárie, pois foi observado em níveis maiores em indivíduos com alta

prevalência dessa doença (BELSTRØM et al., 2017). A formação de biofilme inicia-se pela adesão as superfícies dentárias com destaque para o gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus salivarius* como colonizadores principais dessas superfícies (PEREIRA et al., 2012). Se não houver interferência na comunidade microbiana formada, esta irá progredir, desmineralizando os tecidos dentários alcançando a polpa e o sistema de canais radiculares.

A microflora bacteriana do canal radicular é inicialmente dominada por aeróbios e anaeróbios facultativos. A medida que a doença progride, a ecologia dentro do sistema de canais radiculares muda (LEE et al., 2017; HENRIQUES et al., 2016; NEELAKANTAN et al., 2017). Tzanetaki et al., (2015) através da técnica de pirosequenciamento analisaram amostras de canais radiculares de 48 dentes de pacientes com necessidade de retratamento endodôntico ou com polpa não vital. Através de análise de sequência de DNA, e o uso de bancos de dados de bactérias foi identificados vários filos bacterianos, inclusive com mais de 100 gêneros de microrganismos identificados. O filo *Firmicutes* tem alta prevalência (32,9%), tendo outros filos com menor representação, como por exemplo, *Actinobacteria* (8,1%), *Synergistetes* (7,4%), *Fusobacteria* (7,4%), *Proteobactérias* (5,2%), *Spirochaetes* (1,9%) e *Tenericutes* (0,5%) entre outros. Dentro dos casos de infecções primárias, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (que abriga o gênero *Enterococcus*) foram encontrados em igualdade de abundância, enquanto *Bacteroidetes* foi mais abundante em infecções persistentes .

Os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* estão presentes na infecção endodônticas persistentes e infecções periapicais e o uso de soluções irrigantes eficazes e medicamentos intracanal ativos, contra esses microrganismos, é importante para prevenir falhas de terapia endodôntica (KOVAC et al., 2013).

O habitat normal do *E. faecalis* é o intestino gastrointestinal e genitourinário e não a cavidade oral, sendo este microrganismo considerado transitório na cavidade bucal (VIDANA et al., 2010). Entretanto, *E. faecalis* está presente nos casos de falha endodôntica, ou seja, na cavidade oral de pacientes que já realizaram tratamento endodôntico, mas que necessitam de retratamento (HENRIQUES et al., 2016). Assim foi encontrado associação entre presença do microrganismo na saliva e no canal de pacientes com necessidade de retratamento. Uma possível explicação seria que os canais obturados de forma insatisfatória ou com microinfiltração coronal poderiam fornecer mais espaço e nutrição do que em canais radiculares bem obturados, e o espaço disponível poderia criar um sistema anaeróbio facultativo no meio ambiente local (WANG et al., 2012). Tornando-se um ambiente propício ao microrganismo.

ZHANG et al, (2015) encontraram que o *E. faecalis* foi mais prevalente em infecções intrarradiculares persistentes em comparação com a periodontite periapical crônica primária (sem tratamento). A prevalência de *E. faecalis* em diferentes formas de lesões primárias pode haver variação. Foi observado na literatura que, usando o método de cultura em placa as infecções primárias e persistentes variam de 2 -13% e 8 -71%, respectivamente. Usando o método de reação em cadeia da polimerase a presença de *E. faecalis* em lesões primárias e persistentes variam de 5 -82% e 10-90%, respectivamente (ZHANG et al., 2015). Essas diferenças entre prevalências podem ser atribuídas ao tamanho da amostra dos estudos, à qualidade do tratamento inicial, ao material de preenchimento dos canais e às diferentes técnicas de identificação dos microrganismos. Contudo, o tratamento inadequado do canal radicular pode ser a causa de infecções intracanal persistentes de *E. faecalis*.

Além da limpeza profunda do canal, da modelagem do conduto e da obturação, a selagem coronal hermética durante e após o tratamento do canal radicular são essenciais para prevenir a contaminação por *E. faecalis* e uma nova colonização (WANG et al., 2012). Pois Tsesis et al, (2017), usando microscopia de varredura laser confocal (CLSM), em modelo *ex vivo*, encontrou a profundidade máxima de penetração nos túbulos dentinários na porção apical da raiz de *E. faecalis* foi de até 1643 µm e uma média de 755 µm nos dentes analisados. O que pode dificultar a ação das soluções nessa profundidade.

Mas a ação antimicrobiana pode não ser efetivo também devido à resistência aos antibióticos. Assim, foram avaliados cepas isoladas de canais radiculares de pacientes com periodontite apical confirmados por radiografia e necrose pulpar, mas com paredes da câmara pulpar intactas. 13 isolados (32%) foram positivos para pelo menos um dos alvos de genes de resistência a antibióticos. Quarenta e dois por cento dos dentes infectados abrigavam pelo menos uma estirpe positiva para os genes alvo de resistência a antibióticos. Principalmente as beta-lactamase que foi encontrado em 17% das cepas e 6/26 (23%) dentes. A relevância clínica da resistência à tetraciclina na endodontia é principalmente relacionada ao uso de soluções de irrigação contendo este medicamento, como o MTAD. O conhecimento do potencial de padrão de resistência aos antibióticos em membros da microbiota endodôntica pode influenciar o processo de tomada de decisão de prescrição antibiótica em endodontia (RÔÇAS e SIQUEIRA JÚNIOR, 2012).

1.3 Soluções irrigadoras de canais radiculares disponíveis no mercado

Um passo decisivo para o sucesso do tratamento endodôntico é a irrigação intracanal (BASRANI e HAAPASALO, 2012; NAKAMURA et al., 2013). Um irrigante intracanal ideal deve possuir um amplo espectro antimicrobiano e alta eficácia contra microrganismos anaeróbios e facultativos organizados em biofilmes. Dissolver restos de tecido de polpa necrótica e inativar endotoxinas sem ser tóxico aos tecidos periapicais. Além de prevenir a formação de *smear layer* durante a instrumentação ou dissolver este último uma vez formada (ZEHNDER, 2006).

Os principais produtos utilizados como irrigantes de canais radiculares são hipoclorito de sódio (NaOCl), gluconato de clorexidina e MTAD (mistura de doxiciclina, ácido cítrico e um detergente-Tween 80) (BORZINI et al., 2016; JAJU; JAJU, 2011). NaOCl tem demonstrado maior eficácia antimicrobiana no espaço endodôntico do que outras soluções de irrigação. Ele apresenta propriedades desejáveis e há muito tempo é utilizado pelo endodontista na prática clínica, sendo considerado o melhor irrigante endodôntico (IQBAL, 2012). Apresenta várias concentrações na utilização no espaço endodôntico sendo a concentração de 5,25% é mais efetiva que na concentração de 1%, na desinfecção do canal radicular (NAKAMURA et al., 2013).

Entretanto enquanto um solvente proteolítico muito eficaz, é extremamente citotóxico e deve ser usados com prudência e cautela em terapia endodôntica. Mesmo a sugestão de que NaOCl, em alguma diluição só afetará o tecido necrótico deve ser abandonada (BORZINI et al., 2016; PASHLEY et al., 1985). Além disso, apesar da substância apresentar várias propriedades desejadas, ela sozinha não é capaz de limpar totalmente o sistema de canais radiculares de detritos orgânicos e inorgânicos e biofilme (BASRANI e HAAPASALO, 2012).

GUIVARC'H et al., (2017) mostraram que apesar de não parecer comum o extravasamento de hipoclorito de sódio para os tecidos periapicais, durante o preparo biomecânico, quando ocorre, pode levar a sérios danos a estes tecidos como dor, hemorragia, inchaço, hematoma, disfagia, dispneia, sinais neurológicos, necrose e trismo. Mesmo que em menor ou em maior número de casos, quando presentes, esses sinais e sintomas foram agudos e de início súbito.

Além disso, no estudo com hipoclorito de sódio a 5,25% a ativação sônica de irrigantes por meio de *EndoActivator* e *Vibringe* não melhoraram significativamente a penetração de vedantes em relação à irrigação convencional. Ou seja, a utilização de

diferentes sistemas de irrigação de ativação/entrega não altera a penetração do selante nos túbulos dentinários em comparação aos irrigantes endodôntica com agulha (convencional). Não foram encontradas diferenças significativas em todos os parâmetros relacionados à penetração do selante em associação com diferentes sistemas de irrigação avaliados (GENERALI et al., 2017). Isto pode está relacionado à dificuldade do hipoclorito de sódio em penetrar em todos os micro-canais, impedindo dessa forma uma maior penetração do material selante.

A clorexidina foi desenvolvida no final da década de 1940 nos Laboratórios de Pesquisas da Imperial Chemical Industries Ltd. (Macclesfield, Inglaterra). Inicialmente, o objetivo era obter substâncias antivirais. No entanto, eles tiveram pouca eficácia antiviral e foram colocados de lado, para serem redescobertos alguns anos depois como antibacterianos (ZEHNDER, 2006). A clorexidina é relativamente não tóxica, mas sua eficácia é questionável, sendo que alguns autores relataram uma atividade reduzida contra o biofilme de *E. faecalis* e endotoxinas em comparação com NaOCl (BORZINI et al., 2016). Ela é recomendada quando o único requisito é a atividade antimicrobiana, sobretudo em lesões refratárias (CÂMARA et al., 2010). A revisão feita por Mohammadi et al., (2014) mostrou que a clorexidina apresenta boa substantividade sendo recomendado como um enxaguante final do canal, não sendo indicado como um irrigante principal. Isto se deve a dificuldade de dissolução de tecido e na atividade antimicrobiana reduzida em biofilmes.

A ação antimicrobiana de MTAD é devido à sua formulação complexa, mas mesmo assim, não é capaz de desintegrar completamente e remover o biofilme de *E. faecalis* (BORZINI et al., 2016). Apesar ser menos citotóxica, sua eficácia contra fungos é controverso e necessitam ser mais bem avaliados. Desse modo, todos os irrigantes apresentam vantagens e limitações, assim nenhum irrigante de canais radiculares mostrou-se ideal, ou seja, nenhum satisfaz todos os requisitos (JAJU e JAJU, 2011).

1.4 Plantas medicinais e sua atividade antimicrobiana na Odontologia

As plantas medicinais têm uma história de uso milenar, e a ciências vem descobrindo vários efeitos terapêuticos dos compostos presentes nessas plantas, muitas vezes atuando de forma sinérgica. O interesse pela natureza como fonte de possíveis agentes quimioterapêuticos continua. Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo. As plantas contribuem com pelo menos 25% do total (GURIB-FAKIM, 2006).

Apesar de o Brasil apresentar uma ampla biodiversidade, a produção científica sobre o uso das plantas medicinais ou fitoterápicos na odontologia ainda é escasso (CASTRO et al., 2014). Além disso, a indústria de fitoterápicos no Brasil tem apresentado uma redução nos últimos anos. Isso se deve a problemas burocráticos principalmente relacionados à legislação, a falta de insumos de qualidade, e a falta de incentivos dos órgãos governamentais, apesar das políticas públicas de apoio (HASENCLEVER et al., 2017).

Apesar disso, as pesquisas desenvolvidas com agentes fitoterápicos têm havido interesse crescente na avaliação de extratos de plantas com um potencial de aplicação terapêutica em odontologia (FREIRES e ROSALEN, 2016). A aplicação da fitoterapia na Odontologia já se mostrou eficaz na atividade antimicrobiana de patógenos da cárie dentária, como *Streptococcus mutans*. Também apresentou atividade específica no desenvolvimento e progressão dessa lesão, como por exemplo, adesão de microrganismos bucais nas superfícies duras (FRANCISCO, 2010). Vários estudos já buscaram e identificaram o potencial antimicrobiano de plantas do semiárido paraibano contra bactérias e espécies do gênero *Candida* e *Enterococcus faecalis* que estão relacionadas à infecção endodôntica (COSTA et al., 2013; GOMES et al., 2013; ROCHA et al., 2013).

ROCHA et al., (2013) mostraram que o extrato hidroalcoólico 70% da folha de *Tabebuia pentaphylla* Vell. (ipê rosa) apresentou atividade contra três espécies de bactérias orais: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pela técnica difusão em ágar. Já quando foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo os resultados foram superiores com todos os extratos analisados de folhas e cascas de *Syderoxylum obtusifolium* Roem e Schult (quixabeira), *T. pentaphylla* Vell. (ipê rosa) e *Guapira graciliflora* Mart. (joão-mole) e folhas de *Bauhinia forficata* Linn (mororó), *Anadenanthera colubrina* Brenan (angico) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro) apresentando atividade antimicrobiana contra o *S. aureus*. Enquanto que para *E. faecalis* *B. forficata* Linn, *T. pentaphylla* Vel (folha e casca) *G. graciliflora* Mart (folha e casca) houve atividade determinada pela concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

Por outro lado, a *E. faecalis* apresentou resistência para *S. obtusifolium* Roem e Schult (quixabeira) quando foi utilizado a folha ou a casca, na determinação da CIM e CBM. Ao passo que apresentou resistência da CBM quando utilizado *A. colubrina* Brenan (casca) e *S. tuberosa* Arruda (casca) (ROCHA et al., 2013). Enquanto outro estudo com espécies de plantas também do semiárido paraibano, através do método difusão em ágar mostrou que a *E. faecalis* foi susceptível à *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan (angico), *Schinus terebintifolius* Raddi (aroeira-da-praia), *Maytenus rigida* Mart. (bom-nome), *Bauhinia*

forficata Linn (mororó) e *Spondias tuberosa* A. Câm. (umbuzeiro). Para *Candida albicans* atividade antimicrobiana foi obtida com *Bauhinia forficata* Linn (mororó) e *Pseudobombax marginatum* (embiratanha) (COSTA et al., 2013).

Em outro estudo com plantas do semiárido da Paraíba com ensaio de difusão em ágar o crescimento de *S. mutans*, *S. salivarius*, *L. casei*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. krusei* não foi inibido por nenhuma concentração de extratos de *Acanthospermum hispidum* (Carrapicho-de-cigano), *Ximenia americana* (Ameixa) e *Schinopsis brasiliensis* (Braúna). O extrato de casca da *X. americana* mostrou atividade contra *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. oralis*. Quando os extratos foram analisados pela técnica de microdiluição em caldo, o extrato de *X. americana* apresentou atividade contra *S. Aureus*, *E. faecalis* e *S. oralis*. *Schinopsis brasiliensis* apresentou atividade contra *P. aeruginosa*; *E. faecalis*; *S. aureus*; *S. oralis*. Estudo de toxicidade indicou também que *X. americana* não é tóxica (SILVA et al., 2012).

Outros extratos demonstram bons resultados contra *Candida albicans*: *E. arvense* L., *G. glabra* L. *P. granatum* L. e *S. barbatimam* Mart. (OLIVEIRA et al., 2013). Extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico), planta encontrada no semiárido paraibano, utilizado contra *Candida albicans* mostrou atividade antimicrobiana, através da concentração inibitória mínima. Entretanto a concentração fungicida mínima foi elevada (1mg/ml) o que sugere inibição do crescimento do microrganismo sem causar morte do biofilme de *C. albicans*. O estudo sugeriu que *A. colubrina* tem compostos com atividade antifúngica, que são capazes de inibir o crescimento celular de *Candida albicans* e a formação de biofilme, causando consideráveis alterações na estrutura deste microrganismo (LIMA et al., 2014).

Alternativas a produtos convencionalmente utilizados como irrigação intracanal com o uso de fitoterápicos já apresentam resultados positivos. A utilização de *Morinda citrifolia* (amora indiana) demonstrou eficácia semelhante ao NaOCl em solução irrigadora intracanal (TEWARI et al., 2016). Outros resultados *in vitro* já demonstraram atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* com o uso do própolis, *Azadirachta índia*, *Citrus limonum*, *Aloe vera*, *Psoralea corylifolia*, *Psidium guajava*, *Acacia nilotica* (TEWARI et al., 2016).

Vários estudos buscaram comparar a atividade antimicrobiana de plantas medicinais e soluções irrigadoras comerciais, principalmente com hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina, contra bactérias comumente presentes no canal radicular infectado (ABBASZADEGAN et al., 2014; PODAR et al., 2015; MISTRY et al., 2014; MISTRY et al., 2016; PRABHAKAR et al., 2010; VALERA et al., 2013). Os resultados com *Ferula gummosa* se mostraram superiores ou inferiores dependendo do microrganismo testado,

quando comparado com clorexidina e hipoclorito de sódio (ABBASZADEGAN et al., 2014). Em outro estudo com *Azadirachta indica* e *Morinda citrifolia juice* mostraram eficácia comparável ao hipoclorito de sódio 3% (PODAR et al., 2015).

Outro estudo teve como resultado que o hipoclorito de sódio a 5% apresentou atividade antibacteriana máxima contra *E. faecalis* de 3 e 6 semanas em biofilme formado no substrato dental. Triphala (IMPCOPS Ltd, Chennai, India) e MTAD mostraram completa erradicação em biofilme de 3 semanas. Triphala, *Camellia sinensis* e MTAD mostraram atividade antibacteriana estatisticamente significativa contra o biofilme de 6 semanas (PRABHAKAR et al., 2010). Para estes autores, o uso de alternativas à base de plantas como irrigante do canal radicular pode provar ser vantajoso considerando as diversas características indesejáveis de NaOCl e que pesquisas adicionais são necessárias para recomendar conclusivamente as plantas como soluções de irrigante do canal radicular.

Estudo *ex vivo* de Valera et al., (2013) compararam o extrato de *Aloe vera*, *Zingiber officinale* (gingibre) e óleo de *Ricinus communis L.* (óleo de mamoma) em relação ao hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% em dentes humanos num estudo *in vitro*. Apenas o hipoclorito de sódio e a clorexidina foram capazes de inibir completamente o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em amostras do imediatamente pós instrumentação biomecânica e após uma semana em biofilmes maduros de 21 dias previamente formados.

Apesar do estudo não citar quais foram as concentrações dos extratos utilizados, o óleo de mamoma conseguiu reduzir significativamente as colônias de *C. albicans* e *E. faecalis* assim como o gengibre, sendo os resultados estatisticamente semelhantes ao hipoclorito de sódio e a clorexidina. Entretanto, após sete dias houve novo crescimento microbiano. A *aloe vera* não foi capaz de eliminar eficazmente esses microrganismos, sendo comparado ao controle negativo (solução salina). Uma falha no estudo foi não indicar a concentração dos extratos utilizados, o que influencia fortemente a atividade destes compostos.

1.5 Plantas medicinais utilizadas neste estudo

A seleção do material vegetal para este estudo baseou-se nos dados etnobotânicos sobre o uso tradicional de plantas da região semiárida (AGRA et al., 2008).

1.5.1 *Ximenia americana* L. (Ameixa)

Esta espécie vegetal pode ser encontrada nas Américas, África e Oceania. Tem um amplo uso pelas populações dessas localidades como alimento e para combate a diversas enfermidades. Assim todas as partes da planta são utilizadas: frutos, sementes, folhas e casca do caule (figura 1) (CHAVES et al., 2014; MAGASSOUBA et al., 2007). Pertencente à família Olacaceae, no Brasil e no semiárido, ela é utilizada como anti-inflamatório e cicatrizante, para dor, obesidade, diabetes, tosse, rouquidão, constipação, doença venérea, osteoporose, ferida, gastrite, úlceras bucais, dor de dente, lesões em diabéticos etc. (BITU et al., 2015; CHAVES et al., 2014; MACEDO et al., 2018).

Na África, a planta é utilizada no combate a mais de 40 doenças, sobretudo infecciosas e inflamatória, inclusive, dor de dente, dor de garganta, gengivite e infecções por *Candida ssp.* (LE et al., 2012). A forma de utilização também é variada, sendo usada a casca, folha, raízes e frutos para infusão, como expectorante, deixada em água e em misturas com outros produtos (BITU et al., 2015; MACEDO et al., 2018). Estudos científicos já demonstraram a atividade antimicrobiana da espécie contra vários microrganismos, como: *Escherischia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, quando utilizada isoladamente ou com efeitos sinérgicos com drogas comerciais (OGUNLEYE e IBITOYE, 2003; SILVA et al., 2015).

Figura 1 – fotos da espécie *Ximenia americana* L. A - Localização da espécie no meio ambiente; B- Folhas; C- Caule; D- Flor; E- Folhas e Frutos.



Fonte: BRASILEIRO et al., 2008.

1.5.2 *Croton blanchetianus* Baill (Marmeleiro)

Pertencente à família Euphorbiaceae, o marmeleiro é uma planta medicinal utilizada pela população do Nordeste para sangramento menstrual, ferida, dor de barriga, dor, problemas estomacais e vômito (figura 2). A preparação de infusão é feita com o uso da casca ou deixando a planta medicinal de molho na água em temperatura ambiente, para posterior ingestão. No semiárido nordestino também são utilizados o caule, raiz e as folhas na forma de decocção e maceração para problemas estomacais, mal-estar, gripe, tosse etc. (BITU et al., 2015; MACEDO et al., 2018).

Figura 2 - Vista panorâmica da *Croton blanchetianus* Baill.



Fonte: ANGÉLICO, E. C. (2009).

1.5.3 *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz (Catingueira)

Fazendo parte da família Fabaceae a *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz, conhecida como catingueira (figura 3), é utilizada pelas comunidades no Nordeste para gripe, tosse, sangramento, dor de barriga, dor de dente, vermífugo, reumatismo, dor generalizada etc. As partes da planta utilizadas são a flor, casca do caule, folha, raiz e fruta na forma de decocção, infusão, maceração e suco (MACEDO et al., 2018). A literatura já mostrou sua atuação sinérgica com antibióticos sintéticos, além do efeito antioxidante da espécie (CHAVES et al., 2016).

Figura 3 - *Poincianella pyramidalis*: a espécie no meio ambiente (A); Floração (B) e Detalhe das flores (C).

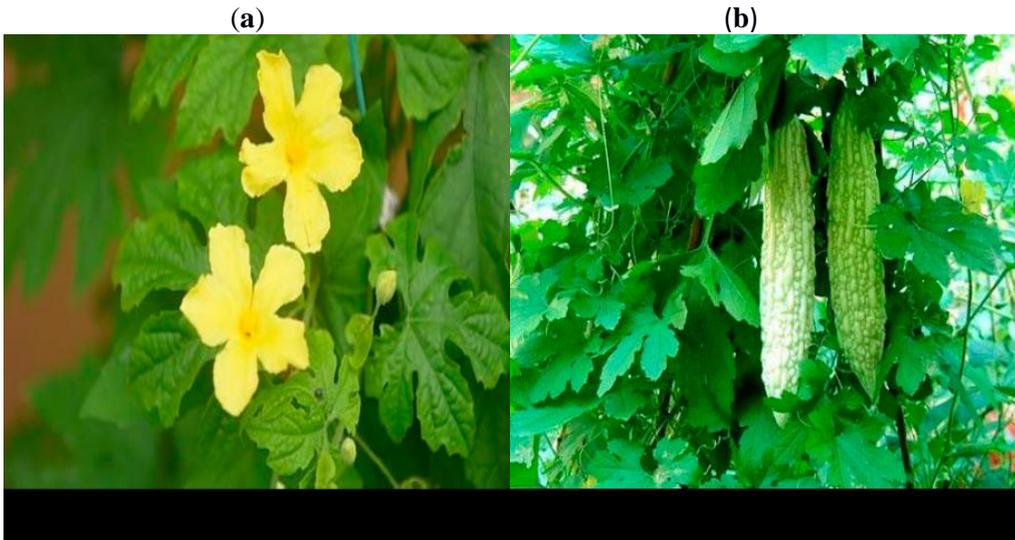


Fonte: LIMA, 2014.

1.5.4 *Momordica charantia* L. (Melão de São Caetano)

Membro da família Cucurbitaceae, é amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo. São utilizados os frutos, folhas e raízes como remédio para dor de dente, diarreia, furúnculo, diabetes etc. (JIA, SHEN, XIE 2017) (figura 4). Atividade antimicrobiana do extrato etanólico do fruto de *M. charantia* L. foi observado contra diversos microrganismos padrão e multirresistente de bactérias e fungos, como *Candida albicans* e *Escherichia coli* (LUCENA FILHO et al., 2015); além de várias outras espécies bacterianas como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, obtendo valores de CIM menores que 1mg / mL tanto para folha, quanto para o fruto (BRANDÃO et al., 2016).

Figura 4 - Características de *Momordica charantia* folhas e flor (a); fruto imaturo (b).



Fonte: JIA, SHEN, XIE 2017.

1.5.5 *Schinopsis brasiliensis* engl. (Braúna)

Conhecido como braúna, baraúna, braúna-do-sertão, quebracho etc. a *Schinopsis brasiliensis* engl. (Anacardiaceae) é uma espécie encontrada no semiárido nordestino (figura 5), sendo endêmica no Brasil (MOREIRA, 2009). Na medicina popular do Nordeste o caule, casca do caule, folhas, frutos e a resina da braúna são usados no tratamento de fraturas, inflamações em geral, impotência sexual, inflamação na garganta, tosse, gripe e diarreia (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Estudos sugerem que a *S. brasiliensis* engl. tem um potencial modulador de resistência microbiana que poderia ser utilizada como coadjuvante em tratamento de infecção por *S. aureus* (SILVA et al., 2015). Testes realizados demonstraram que o extrato obtido a partir da casca de *S. brasiliensis* é um antimicrobiano, e com a capacidade de modular a resistência de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo considerado de baixa toxicidade (CHAVES et al., 2015).

Figura 5 - *Schinopsis brasiliensis* engl.: folhas e flores.



Fonte: Livro Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Vol.1 pag. 22 *apud* MOREIRA, 2009.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma solução irrigadora intracanal radicular com atividade antimicrobiana.

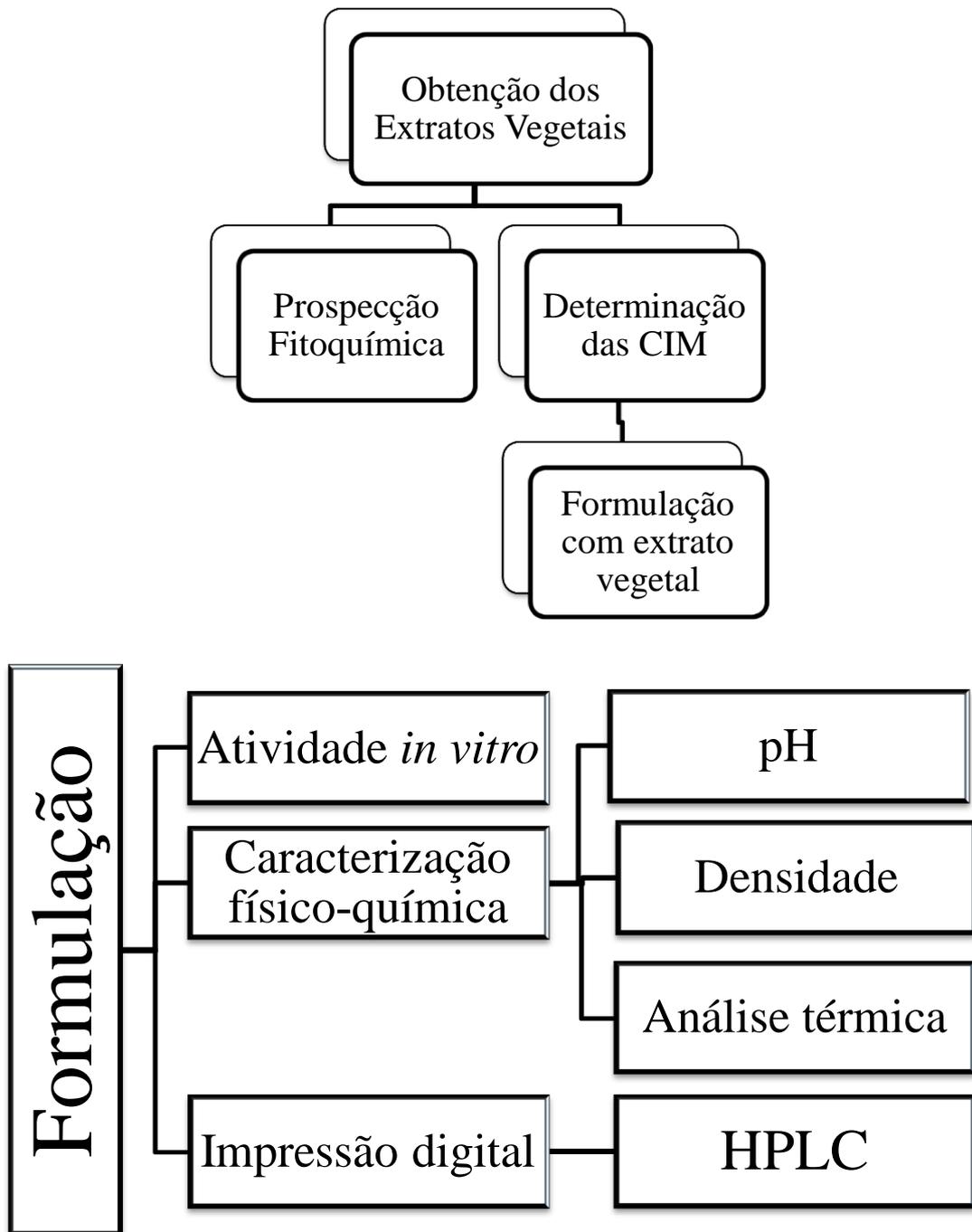
2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos das plantas selecionadas por métodos de extração diferentes;
- Verificar a ação antimicrobiana *in vitro* dos extratos obtidos frente à *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*;
- Determinar a CIM e a CBM/CFM da solução irrigadora desenvolvida frente à *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*;
- Realizar a prospecção fitoquímica do extrato vegetal incorporado a solução intracanal;
- Determinar o marcador químico da formulação;
- Avaliar parâmetros físicos-químicos da formulação;
- Caracterizar por análise térmica, o extrato e excipientes utilizados na produção da solução irrigadora desenvolvida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de realização da metodologia estão distribuídas no fluxograma da figura 6.

Figura 6: Fluxograma das etapas da metodologia realizada.



3.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo de abordagem indutiva com procedimento comparativo e técnica de documentação direta em laboratório (LAKATOS e MARCONI, 2003). Foi um estudo laboratorial *in vitro*.

3.2 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM) do Departamento de Farmácia, integrante do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

3.3 Material vegetal

Foram analisadas 05 (cinco) plantas medicinais (folhas e/ou cascas) presentes no semiárido Brasileiro. São elas: *Ximenia americana* L. (Ameixa), *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (Catingueira), *Croton blanchetianus* Baill (Marmeleiro), *Schinopsis brasiliensis* (Braúna) e *Momordica charantia* (Melão de São Caetano). A coleta das plantas foi realizada na região semiárida do Estado da Paraíba.

Após coleta, foram feitas a identificação do material vegetal, para confirmar a autenticidade da planta (tabela 1). Em seguida, os materiais vegetais foram secos em estufa de circulação de ar a 40°C até estabilização do peso e posterior pulverização em moinho de facas de 10 mesh Wiley.

Tabela 1- Plantas selecionadas para este trabalho

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Local da coleta	Excicata
<i>Ximenia americana</i> L.	Ameixa	Folha e casca	7°08'33,8" S 36°06'21,1" W	EAN-100493
<i>Cronton blanchetianus</i> Baill	Marmeleiro	Casca	7°32'37,67" S 35°44'45,82" W	CCTR- 4946
<i>Poincianella pyramidalis</i>	Catingueira	Casca	7°07'54,53" S 36°07'14,51" W	CSTR - 5036
<i>Momordica charantia</i>	Melão de São Caetano	Folha	7°13' S 35°55' W	EAN – 257 - ACAM
<i>Schinopsis brasiliensis</i> engl.	Braúna	Folha	7°13'50" S 35° 52' 52" W	EAN - 100493

3.4 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos pelos métodos extrativos: maceração (7 dias em temperatura ambiente ao abrigo da luz), turbólise (3 mil rpm por 15 minutos) e ultrassom (em banho maria a 40°C por 1 hora) na concentração da solução hidroalcoólica 50, 70 e 90 % (v/v) para cada planta e método utilizado. A proporção usado foi de 20%, ou seja, de 200 gramas de material vegetal para 1000 ml de solução hidroalcoólica. Após filtragem, os extratos foram submetidos à evaporação a vácuo, em rotaevaporador, para obtenção dos extratos secos.

3.5 Caracterização da atividade antimicrobiana

Para caracterização da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços de fundo em “U”.

3.5.1 Cepas

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), as quais foram disponibilizadas pela Fundação

Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). As cepas liofilizadas foram reativadas, em câmara asséptica, seguindo as recomendações da referida Fundação.

3.5.2 Meios de cultura

Para manutenção e crescimento dos microrganismos em placas petri, foi utilizado o meio de cultura *Brain Heart Infusion Agar* (BHI ágar) para bactérias e o Ágar Sabouraud Dextrose para fungos. Para os testes de atividade antimicrobiana em microplaca, foi utilizado o meio Mueller Hinton caldo para bactérias e Sabouraud Dextrose caldo para leveduras.

3.5.3 Preparação da suspensão microbiana

Inicialmente os microrganismos foram reativados em caldo BHI e sabouraud dextrose por 24 horas para bactérias e fungos, respectivamente. Depois os microrganismos foram semeados em meio de cultura sólido por 24 e 48 horas para preparação do inoculo de bactérias e fungos, respectivamente. O inoculo microbiano foi padronizado conforme descrito na *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, para bactéria e 530 nm, para fungos, de modo a obter a transmitância de 85% que equivale a 1×10^8 UFC/mL.

3.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição

Concentração inibitória mínima (CIM): A menor concentração de um agente antimicrobiano que impede crescimento de um microrganismo no teste de diluição em caldo (CLSI, 2008). É utilizado para quantificar a atividade antimicrobiana de plantas selecionadas para estudo.

As placas receberam 100 μ L de Mueller Hinton ou caldo Sabouraud, para bactérias e fungos, respectivamente. Os extratos foram diluídos em água destilada estéril e transferidos para o primeiro poço com concentração inicial de 1000 μ g/mL. A partir daí foram realizadas diluições seriadas até a concentração do extrato em 7,6 μ g/ml e os 100 μ L do último poço foi desprezado. Em seguida foi depositado 100 μ L/poço do inoculo microbiano devidamente ajustado em cada poço.

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ$ C por 24 horas para bactérias; e $28 \pm 2^\circ$ C, por 48 horas para fungos. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano visível após 24 horas. Confirmado pela adição de resazurina a 0,01% em cada poço e verificação, após 2 horas, de mudança de cor do meio. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três momentos diferentes.

Nos ensaios foram utilizados controle de esterilidade do meio (ausência de crescimento microbiano ou de contaminação) e controle de viabilidade de crescimento (crescimento do microrganismo sem agentes inibidores). Além disso, foi utilizado como controle positivo o digluconato de clorexidina 0,12% na susceptibilidade de bactérias e a nistatina para o teste de susceptibilidade de fungo.

3.5.5 Solução irrigadora

Após a seleção do extrato com melhor atividade antimicrobiana, foi desenvolvida uma formulação intracanal radicular e novos testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida/fungicida mínima. Assim, foi desenvolvida uma formulação intracanal com tensoativo aniônico preconizado Appel e Reus, (2005) e a utilização da casca de *Ximenia americana* L. (tabela 2):

Tabela 2 - Formulação da solução intracanal desenvolvida

Substância utilizada	Concentração
Lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio	2%
Metilparabeno	0,18%
<i>Ximenia americana</i> L. (casca)	1%
Água purificada q.s.p	100ml

Inicialmente é necessário aquecer 50 ml de água estéril com adição, aos poucos, do Metilparabeno e Lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio para evitar a intensa formação de espuma. Em seguida foi adicionado o restante da água e o extrato vegetal de *Ximenia americana* L. extraída pelo método de turbólise em solução hidroalcoólica 50% (v/v) devido aos melhores resultados antimicrobianos encontrados com esse método. A formulação foi estocada em temperatura ambiente sob o abrigo da luz direta para evitar a precipitação dos seus componentes, quando em baixas temperaturas. Assim como manter as propriedades antimicrobianas por todo o período de teste.

3.5.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução intracanal

Seguiu-se a metodologia descrita no item 3.5.4, com a substituição dos extratos pela solução teste e o controle positivo pelas soluções comerciais, ou seja, solução com hipoclorito de sódio a 1, 2,5 e 5% e solução de gluconato de clorexidina 0,12%.

3.5.7 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)

Para determinação da concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima, foram removidos uma alíquota de 20 µL dos poços correspondentes a CIM, CIM x 2 e CIM x 4 e gotejados em triplicata sobre placas petri, contendo meio BHI Ágar (bactérias) e Ágar Sabouraud Dextrose (leveduras), e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para bactérias; e $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas para fungos. As CBM/CFM foram definidas como a menor concentração do extrato testado que inibiu o crescimento visível de colônias no meio utilizado.

3.6 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da solução desenvolvida

Após o desenvolvimento da formulação com o extrato vegetal selecionado, foi feita a avaliação dos parâmetros físicos-químicos da solução com a presença e ausência do extrato de *X. americana* L. Inicialmente, realizou-se a análise estatística descritiva objetivando caracterizar as amostras. Foram calculadas medidas de tendência central e de variabilidade para os valores de pH e densidade (g/cm^3) das soluções testadas em um densímetro digital (Anton Paar, versão DMA 35 portátil). Em seguida, empregou-se a Análise de Variância (ANOVA) com teste *post-hoc* de Tukey HSD para determinar diferenças significativas entre as soluções quanto aos parâmetros testados (LARSON; FARBER, 2016). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas usando o *software* IBM SPSS Statistics versão 20.0 e considerando um intervalo de confiança de 95%.

3.7 Prospecção fitoquímica

Foi realizado um estudo quantitativo, por espectrofotometria UV-VIS, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240, dos principais metabólitos secundários (polifenóis, taninos e flavonoides) presentes no extrato bruto de *X. americana* L.. Essa caracterização é realizada com a finalidade de se identificar os constituintes presentes em maior quantidade na planta selecionada. Para isso foi construída uma curva de calibração, com soluções obtidas com os extratos produzidos, comparando-as com a curva de calibração obtida com os padrões de referência utilizado na identificação dos metabólitos secundários. O conteúdo total de cada constituinte identificado foi expresso em miligramas equivalentes ao

padrão utilizado. Os valores do teor e de margem foram feitos em porcentagem para realizar a conversão para mg/g.

3.7.1 Quantificação espectrofotométrica de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al., (2005). Cinco mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl_3 a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 .

Utilizou-se para esta determinação uma curva de calibração obtida a partir de soluções de quercetina nas concentrações de 2 a 30 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.7.2 Quantificação espectrofotométrica de polifenóis

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro, contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 .

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 1 a 40 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata. As concentrações foram expressas em mg/g que são de equivalentes do padrão utilizado para o metabólito.

3.7.3 Quantificação espectrofotométrica de taninos

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22°C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi realizada utilizando-se soluções de catequina nas concentrações de 10 a 100 µg/mL. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.8 Determinação do marcador fitoquímico (impressão digital)

A análise cromatográfica foi feita utilizando um cromatógrafo líquido HPLC Pominence, marca Shimadzu, com detector UV-Vis acoplado ao software LC solution da Shimadzu. A coluna utilizada foi de fase reversa a modelo Gemini C-18, marca Phenomenex, 150 X 4,6 X 3 mm com partículas de 3 µm de diâmetro (pré-coluna Gemini NX, marca Phenomenex, 4 X 30).

A fase móvel consistiu de água acidulada com ácido ortofosfórico à 0,1% (Fase A) e metanol (fase B) em uma proporção 80:20 (A:B). Como padrão foi utilizado o Ácido Gálico (C₇H₈O₆) Anidro (VETEC, Lote: 0904265). A temperatura de forno foi de 30° C e o fluxo de vazão foi de 0,7 mL/min. Em um comprimento de onda de 254 nm. Foi submetido a formulação sem extrato e com o extrato hidroalcoólico diluído em metanol (10%) na proporção de 1:5 na análise cromatográfica a fim de se detectar a presença e a concentração do ácido gálico no extrato, comparando-se ao padrão.

3.9 Caracterização térmica do extrato e excipientes

O extrato de *X. americana* L., os excipientes e a formulação foram caracterizados por análise térmica. As curvas DTA foram obtidas utilizando um módulo de termobalança simultânea, modelo DTG-60 (Shimadzu), utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, com cerca de 2 ± 0,1 mg, sob uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. Os experimentos foram realizados em temperatura crescente no intervalo de 25 a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

4 RESULTADOS

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB. Assim, como resultado da execução desse projeto será apresentado um artigo científico.

Artigo: Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de *Ximenia americana* L.

Desenvolvimento de uma solução irrigadora de canais radiculares utilizando o extrato de *Ximenia americana* L.

Adeilton Félix da Silva¹, Felipe Hugo Alencar Fernandes², Ana Cláudia Dantas de Medeiros¹

¹ Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, 58.429-500 Campina Grande, PB, Brasil.

²Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Estadual da Paraíba, 58.429-500 Campina Grande, PB, Brasil.

RESUMO

As patologias pulpares são frequentemente causadas por microrganismos presentes na cavidade bucal que podem atingir o sistema de canais radiculares e os tecidos periapicais, causando danos. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* as plantas medicinais: *Ximenia americana* L., *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz, *Croton blanchetianus* Baill, *Schinopsis brasiliensis* L. e *Momordica charantia* L. da região semiárido Brasileiro contra microrganismos patogênicos orais, visando a bioprospecção de um novo produto. A seleção do material vegetal para este estudo baseou-se nos dados etnobotânicos sobre o uso tradicional de plantas da região semiárido. Os extratos foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. O extrato de *Ximenia americana* L. foi selecionado para ser incorporado a uma solução de irrigação intracanal, por apresentar melhor resultado (7,8 a 125 µg/mL). Na prospecção fitoquímica, determinou-se o teor de metabólitos secundários através de espectrofotometria no ultravioleta. Assim foi determinada o teor de polifenóis totais (385,52 ± 15,90 mg/g), flavonoides totais (14,79 ± 0,70 mg/g) e taninos condensados (217,30 ± 5,22 mg/g) desta planta. Na análise cromatográfica determinou-se o composto químico majoritário que foi o ácido gálico. Além de estudos de caracterização térmica extrato/excipientes (DTA). Em seguida foram feitos novos testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da formulação produzida, a fim de verificar interferências dos excipientes na atividade final da solução desenvolvida, o que não mostrou interferência da atividade antimicrobiana. Assim, nas condições *in vitro* analisadas as plantas medicinais apresentam boa perspectivas ao desenvolvimento de agentes antimicrobianos para uso odontológico.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Endodontia. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Atividade antimicrobiana. Semiárido Nordeste. *Ximenia americana* L.

ABSTRACT

Pulp pathologies are often caused by microorganisms present in the buccal cavity that can reach the root canal system and the periapical tissues, causing damage. The objective of this work was to evaluate in vitro the medicinal plants: *Ximenia americana* L., *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz, *Croton blanchetianus* Baill, *Schinopsis brasiliensis* L. and *Momordica charantia* L. from the Brazilian semi-arid region against oral pathogenic microorganisms, aiming the bioprospecting of a new product. The selection of plant material for this study was based on ethnobotanical data on the traditional use of plants in the semi-arid region. The extracts were submitted to determination of the Minimum Inhibitory Concentration against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. The extract of *Ximenia americana* L. was selected to be incorporated into an intracanal irrigation solution, as it presented a better result (7.8 to 125 µg / mL). The content of total polyphenols (385.52 ± 15.90 mg/g), total flavonoids (14.79 ± 0.70 mg/g), and condensed tannins (217.30 ± 5.22 mg/g) were determined in the phytochemical prospection, the content of secondary metabolites was determined by ultraviolet spectrophotometry. of this plant. In the chromatographic analysis the major chemical compound that was the gallic acid was determined. In addition to thermal characterization studies extract / excipients (DTA). Further tests were carried out to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the formulation produced in order to verify interferences of the excipients in the final activity of the developed solution, which did not show interference of the antimicrobial activity. Thus, in the in vitro conditions analyzed the medicinal plants present good prospects for the development of antimicrobial agents for dental use.

Keywords: Medicinal plants. Endodontics. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Antimicrobial activity. Northeastern Semi-arid. *Ximenia americana* L.

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal apresenta uma grande diversidade de microrganismos que vivem em relação de benefício mútuo com o hospedeiro. Mas condições específicas locais poderão propiciar o desenvolvimento de cárie e a invasão dos canais radiculares por microrganismos patogênicos (ARWEILER e NETUSCHIL, 2016).

Enterococcus faecalis e *Candida albicans* estão presentes na infecção dos canais radiculares e infecções periapicais, e o uso de soluções irrigantes eficazes e medicamentos intracanaís ativos contra esses microrganismos é importante para prevenir falhas na terapia endodôntica (KOVAC et al., 2013) ou em caso de reinfecção dos canais radiculares (DELBONI et al., 2017).

O interesse por novos agentes antimicrobianos tem aumento recentemente devido à resistência microbiana a muitas drogas disponíveis, como vem ocorrendo com *Candida* spp., (SARDI et al., 2013). As pesquisas com agentes fitoterápicos têm evoluído e tem havido interesse crescente na avaliação de extratos de plantas com uma potencial aplicação

terapêutica em odontologia (BORZINI et al., 2016). Inclusive com o incremento de pesquisas com uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana em ensaios clínicos (FREIRES e ROSALEN, 2016).

O Nordeste brasileiro apresenta uma rica biodiversidade. São usadas mais de 600 plantas medicinais pela população dessa região na cura e tratamento de diversas doenças. Entretanto a maioria das espécies relatadas ainda não foram estudadas quanto a atividade biológica e os constituintes químicos presentes nessas plantas (AGRA et al., 2008). Mas já há estudo com atividade contra *Enterococcus faecalis* com resultados positivos (COSTA et al., 2010).

Desse modo, este trabalho objetiva avaliar extratos de plantas presentes no Nordeste brasileiro com atividade antimicrobiana contra espécies presente em infecções endodônticas, para bioprospecção de novos agentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Foram analisadas 05 (cinco) plantas medicinais presentes no semiárido Brasileiro. São elas: *Ximenia americana* L. (Ameixa), *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (Catingueira), *Croton blanchetianus* Baill (Marmeleiro), *Schinopsis brasiliensis* (Braúna) e *Momordica charantia* (Melão de São Caetano). A coleta das plantas foi realizada na região semiárida do Estado da Paraíba.

Após coleta, foi feita a identificação do material para confirmar a autenticidade da planta (tabela 1). Em seguida, os materiais vegetais foram secos em estufa de circulação de ar a 40°C até estabilização do peso e posterior pulverização em moinho de facas de 10 mesh Wiley para preparação das soluções hidroalcoólicas.

Tabela 1 - Plantas selecionadas para este estudo

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Local da coleta	Excicata
<i>Ximenia americana</i> L.	Ameixa	Folha e casca	7°08'33,8" S 36°06'21,1" W	EAN-100493
<i>Cronton blanchetianus</i> Baill	Marmeleiro	casca	7°32'37,67" S 35°44'45,82" W	CCTR- 4946
<i>Poincianella pyramidalis</i>	Catingueira	casca	7°07'54.53" S 36°07'14.51" W	CSTR - 5036
<i>Momordica charantia</i>	Melão de São Caetano	folha	7°13' S 35°55' W	EAN – 257 - ACAM
<i>Schinopsis brasiliensis</i> engl.	Braúna	folha	7°13'50" S 35° 52' 52" W	EAN - 100493

Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos pelos métodos extrativos: maceração (7 dias em temperatura ambiente ao abrigo da luz), turbólise (3 mil rpm por 15 minutos) e ultrassom (em banho maria a 40°C por 1 hora) na concentração da solução hidroalcoólica 50, 70 e 90 % (v/v) para cada planta e método utilizado. A proporção usado foi de 20%, ou seja, de 200 gramas de material vegetal para 1000 ml de solução hidroalcoólica. Após filtragem, os extratos foram submetidos à evaporação a vácuo, em rotaevaporador, para obtenção dos extratos secos.

Caracterização da atividade antimicrobiana

Cepas

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). As cepas liofilizadas foram reativadas, em câmara asséptica, seguindo as recomendações da referida Fundação.

Meios de cultura

Para manutenção e crescimento dos microrganismos em placas petri, foi utilizado o meio de cultura *Brain Heart Infusion Agar* (BHI ágar) para bactérias e o Ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans*. Para os testes de atividade antimicrobiana em microplaca, foi utilizado o meio Mueller Hinton caldo para bactérias e Sabouraud Dextrose caldo para leveduras.

Preparação da suspensão microbiana

Inicialmente os microrganismos foram reativados em caldo BHI e sabouraud dextrose por 24 horas para bactérias e fungos, respectivamente. Depois os microrganismos foram semeados em meio de cultura sólido por 24 e 48 horas para preparação do inóculo de bactérias e fungos, respectivamente. O inóculo microbiano foi padronizado conforme descrito na *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, para bactéria e 530 nm, para fungos, de modo a obter a transmitância de 85% que equivale a 1×10^8 UFC/mL.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição

O ensaio foi realizado pelo método da microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços. As placas receberam 100 µL de Mueller Hinton ou caldo Sabouraud, para bactérias e fungos, respectivamente. Os extratos foram diluídos em água destilada estéril e transferidos para o primeiro poço com concentração inicial de 1000 µg/mL. A partir daí foram realizadas diluições seriadas até a concentração do extrato em 7,6 µg/ml e os 100 µL do último poço foi desprezado. Em seguida foi depositado 100 µL/poço do inóculo microbiano devidamente ajustado em cada poço.

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para bactérias e $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas para fungos. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano visível após 24 horas. Confirmado pela adição de resazurina a 0,01% em cada poço e verificação, após 2 horas, de mudança de cor do meio. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três momentos diferentes.

Nos ensaios foram utilizados controle de esterilidade do meio e controle de viabilidade de crescimento. Além disso, foi utilizado como controle positivo o digluconato de clorexidina 0,12% na susceptibilidade de bactérias e a nistatina para o teste de susceptibilidade de fungo.

Solução irrigadora

Após a seleção do extrato com melhor atividade antimicrobiana, foi desenvolvido uma formulação intracanal radicular e novos testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida/fungicida mínima. Assim, foi desenvolvida uma formulação intracanal com tensoativo aniônico preconizado Appel e Reus, (2005) e a utilização da casca de *Ximenia americana* L. (tabela 2):

Tabela 2 - Formulação da solução intracanal desenvolvida

Substância utilizada	Concentração
Lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio	2%
Metilparabeno	0,18%
<i>Ximenia americana</i> L. (casca)	1%
Água purificada q.s.p	100ml

Determinação da Concentração Inibitória Mínima da solução intracanal

Seguiu-se a metodologia descrita no item 2.4, com a substituição dos extratos pela solução teste e o controle positivo pelas soluções comerciais, ou seja, solução com hipoclorito de sódio a 1, 2,5, e 5% de gluconato de clorexidina 0,12%.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)

Para determinação da concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima, foram removidos uma alíquota de 20 µL dos poços correspondentes a CIM, CIMx2 e CIMx4 e gotejados em triplicata sobre placas petri, contendo meio BHI Ágar (bactérias) e Ágar Sabouraud Dextrose (leveduras), e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para bactérias e $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas para fungos. As CBM/CFM foram definidas como a menor concentração do extrato testado que inibiu o crescimento visível de colônias no meio utilizado.

Prospecção fitoquímica

Foi realizado um estudo quantitativo, por espectrofotometria UV-VIS, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240, dos principais metabólitos secundários (polifenóis, taninos e flavonoides) presentes nas plantas medicinais estudadas. Essa caracterização é realizada com a finalidade de se identificar os constituintes presentes em maior quantidade na planta selecionada. Para isso foi construída uma curva de calibração, com soluções obtidas com os extratos produzidos, comparando-as com a curva de calibração obtida com os padrões de referência utilizado na identificação dos metabólitos secundários. O conteúdo total de cada constituinte identificado foi expresso em miligramas equivalentes ao padrão utilizado. Os valores do teor e de margem foram feitos em porcentagem para realizar a conversão para mg/g.

Quantificação espectrofotométrica de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al., (2005). 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de $AlCl_3$ a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de $AlCl_3$.

Utilizou-se para esta determinação uma curva de calibração obtida a partir de soluções de quercetina nas concentrações de 2 a 30 $\mu g/mL$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

Quantificação espectrofotométrica de Polifenóis

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro, contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 .

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações

de 1 a 40 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata. As concentrações foram expressas em mg/g que são de equivalentes do padrão utilizado para o metabólito.

Quantificação espectrofotométrica de Taninos

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22°C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi realizada utilizando-se soluções de catequina nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata

Determinação do marcador fitoquímico (impressão digital)

A análise cromatográfica foi feita utilizando um cromatógrafo líquido HPLC Pominence, marca Shimadzu, com detector UV-Vis acoplado ao software LC solution da Shimadzu. A coluna utilizada foi de fase reversa a modelo Gemini C-18, marca Phenomenex, 150 X 4,6 X 3 mm com partículas de 3 μm de diâmetro (pré-coluna Gemini NX, marca Phenomenex, 4 X 30).

A fase móvel consistiu de água acidulada com ácido ortofosfórico à 0,1% (Fase A) e metanol (fase B) em uma proporção 80:20 (A:B). Como padrão foi utilizado o Ácido Gálico (C₇H₈O₆) Anidro (VETEC, Lote: 0904265). A temperatura de forno foi de 30° C e o fluxo de vazão foi de 0,7 mL/min. Em um comprimento de onda de 254 nm. Foi submetido a formulação sem extrato e com o extrato hidroalcoólico diluído em metanol (10%) na proporção de 1:5 na análise cromatográfica a fim de se detectar a presença e a concentração do ácido gálico no extrato, comparando-se ao padrão.

Caracterização da formulação por Análise Térmica Diferencial (DTA)

O extrato de *X. americana* L. e a formulação foram caracterizados por análise térmica. As curvas DTA foram obtidas utilizando um módulo de termobalança simultânea, modelo

DTG-60 (Shimadzu), utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, com cerca de $2 \pm 0,1$ mg, sob uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. Os experimentos foram realizados em temperatura crescente no intervalo de 25 a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Avaliação dos parâmetros físico-químicos da solução desenvolvida

Inicialmente, realizou-se a análise estatística descritiva objetivando caracterizar as amostras da formulação com e sem *X. americana* L. Foram calculadas medidas de tendência central e de variabilidade para os valores de pH e densidade (g/cm^3) das soluções testadas em um densímetro digital (Anton Paar DMA 35 portátil). Em seguida, empregou-se a Análise de Variância (ANOVA) com teste *post-hoc* de Tukey HSD para determinar diferenças significativas entre as soluções quanto aos parâmetros testados (LARSON; FARBER, 2016). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas usando o *software* IBM SPSS Statistics versão 20.0 e considerando um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção antimicrobiana: valores da concentração inibitória mínima

Um total de 48 extratos hidroalcoólicos foram preparados de diferentes espécies de plantas. Os extratos que apresentaram melhores resultados antimicrobianos para ambos os microrganismos foram a casca *X. americana* L. e folha de *S. brasiliensis*; e o pior resultado foi de *M. charantia* (tabela 3 e 4). Santos et al., (2012) pesquisaram a atividade do extrato macerado das folhas de *M. charantia* contra *Candida albicans* e encontrou valores de Concentração Inibitória Mínima similares aos descritos ($\geq 1024 \mu\text{g/mL}$). Apesar de o extrato metanólico das folhas e frutos de *M. charantia* apresentar atividade antimicrobiana contra outras espécies, como *E. coli* e *S. aureus*, com valores menores que 1mg/mL (BRANDÃO et al., 2015; JAGESSAR E GOMES, 2008). Enquanto Lucena Filho et al., (2015) ao utilizar o extrato macerado do fruto de *M. charantia* encontraram atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *E. coli* e isolados clínicos com valores inferiores (3 a $125 \mu\text{g/mL}$).

A *Ximenia americana* L. apresentou os melhores resultados nas espécies microbianas avaliadas. Além de ação antimicrobiana contra outros microrganismos, como *Staphylococcus aureus* resistentes (SILVA et al., 2015). Isto corrobora com amplo uso da planta em diversas partes do mundo e do Brasil como alimento ou na forma de remédio para o combate a diversas doenças (CHAVES et al., 2014; MAGASSOUBA et al., 2007).

Buscaram-se espécies vegetais tradicionalmente utilizadas pelas comunidades do Nordeste do Brasil para tratamento de seus problemas de saúde, para verificação do seu potencial antimicrobiano em espécies microbianas endodônticas (AGRA et al., 2008). Mesmo que as pesquisas recentes avaliem a atividade antimicrobiana de plantas medicinais contra diversos microrganismos patogênicos da cavidade bucal (AKHALWAYA, VUUREN e PATEL, 2018). Mas há uma escassez desses estudos quanto a atividade antimicrobiana em espécies presentes nos canais radiculares.

Quando o extrato de *Ximenia americana* L. foi incorporado em uma formulação mostrou-se que a atividade antimicrobiana foi semelhante ao hipoclorito de sódio a 1% (tabela 5 e 6). Outros estudos já demonstraram a atividade antimicrobiana da *Ximenia americana* L. frente a *Enterococcus faecalis*, com resultado semelhantes ao gluconato de clorexina, pelo método de difusão em ágar ou ensaio de cilindro em placa (SILVA et al., 2012). A *Schinopsis brasiliensis* Engl. também apresentou resultados comparáveis a *Ximenia americana* L. contra *Enterococcus faecalis*, indo de acordo com estudo anterior que demonstra

seu efeito contra outras bactérias orais (CHAVES et al., 2015). Entretanto no estudo de SILVA et al., (2012) para o teste de microdiluição em caldo a concentração inibitória mínima foi alta para *Ximenia americana* e *Schinopsis brasiliensis* (1000µg/mL). Isto provavelmente se deve a diferenças da quantidade no inóculo utilizado e a concentração da solução hidroalcoólica dos extratos (30% (v/v), o que acarreta variabilidade dos resultados, além da sazonalidade da coleta da planta (CHAVES et al., 2013)

Além disso, a utilização de *Artemia salina* indicou a falta de toxicidade para a casca *X. americana* (LC50 = 4.262 ug/mL), enquanto para *S. brasiliensis* a toxicidade foi considerada moderada (LC50 = 428 µg/mL) (SILVA et al., 2012).

Tabela 4 - Avaliação da atividade bacteriana dos extratos frente às cepas de *Enterococcus faecalis*. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$).

Espécies de Plantas	Maceração			Turbólise			Ultrassom		
	50%	70%	90%	50%	70%	90%	50%	70%	90%
<i>Ximenia americana</i> (Casca)	7,8	7,8	7,8	7,8	15,6	7,8	7,8	7,8	7,8
<i>Ximenia americana</i> (Folha)	125	62,5	125	>1000	>1000	>1000	62,5	125	125
<i>Poincianella pyramidalis</i> (casca)	500	250	250	31,2	62,5	62,5	250	250	250
<i>Croton blanchetianus</i> (casca)	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Schinopsis brasiliensis</i> (folha)	15,6	31,2	31,2	15,6	31,2	31,2	7,8	7,8	15,6
<i>Momordica charantia</i> (folha)	1000	500	500	500	1000	500	1000	500	500

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) da formulação de *Ximenia americana* L. (casca) e dos produtos comerciais para *Candida albicans*.

	Solução teste ($\mu\text{g/mL}$)				
	NaClO 1%	NaClO 2,5%	NaClO 5%	Clorexidina 0,12%	Formulação 1%
CIM	62,5	15,62	7,81	9,37	62,5
CFM	62,5	15,62	7,81	9,37	125

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da formulação de *Ximenia americana* L. (casca) e dos produtos comerciais para *Enterococcus faecalis*.

	Solução teste ($\mu\text{g/mL}$)				
	NaClO 1%	NaClO 2,5%	NaClO 5%	Clorexidina 0,12%	Formulação 1%
CIM	125	15,62	3,9	9,37	62,5
CBM	125	31,25	7,8	9,37	125

OBS: foi feito controle de esterilidade e controle de crescimento (viabilidade) celular

Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários e marcador químico

O conteúdo dos metabólitos secundários são apresentados na Tabela 7. O conteúdo do número total de polifenóis e taninos é alto comparado aos flavonóides totais. Outros estudos realizados da fitoquímica com extratos da folha de *X. americana* L. revelaram presença de metabólitos secundários, tais como quercetina, quercitrina, avicularina, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, flavonóides e taninos (LE et al., 2012; OGUNLEYE e IBITOYE, 2003).

A identificação do composto químico principal usando cromatografia líquida foi realizada, e, com base no parâmetro tempo de retenção (TR), foi comparado com os valores TR para o padrão analisado de ácido gálico. Os resultados indicaram a presença de ácido gálico, que pode ser utilizado como marcador químico de *X. americana* (figura 1). Brandão et al., (2014) já havia validado o método HPLC - UV para determinação quantitativa do ácido gálico de *X. americana* L. Um aspecto importante para o controle de qualidade dos produtos fitoterápicos é a determinação do marcador químico, que consiste de um constituinte (ou grupos de constituintes) quimicamente definido e presente no produto vegetal. Fernandes et al., (2015) também desenvolveram um método analítico usando o ácido gálico como

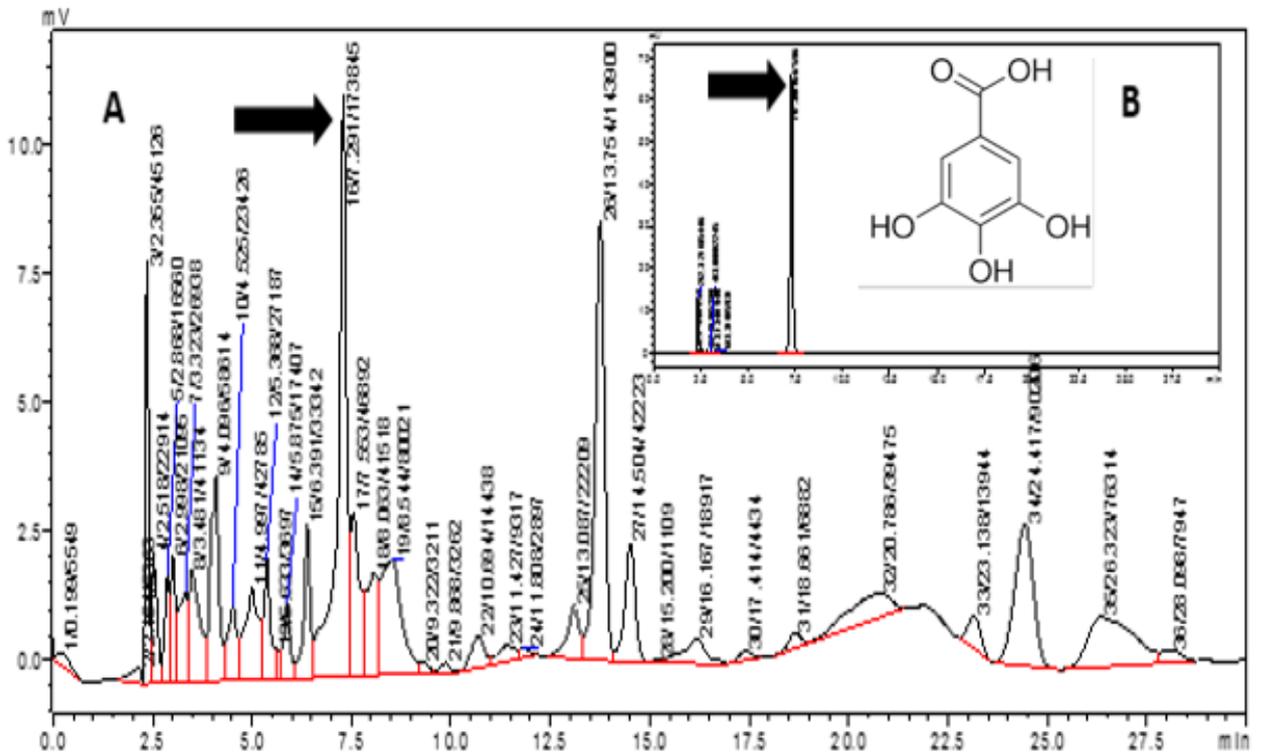
marcador químico para a *Schinopsis brasiliensis* Engl. Concluindo que esse método pode ser usado para controle de qualidade dos fitoterápicos.

Tabela 7 - Teor de metabólitos secundários presentes no extrato da casca de *Ximenia americana* L. obtidos por espectroscopia em região visível.

Metabólitos	Concentração
Polifenóis totais	385,52 ± 15,90 ¹
Flavonoides totais	14,79 ± 0,70 ²
Taninos condensados	217,30 ± 5,22 ³

¹Equivalente de ácido gálico, ² Equivalente quercetina, ³ Equivalente de catequina.

Figura 1 - Cromatograma (HPLC/UV) da formulação com *Ximenia americana* L. (A) e ácido gálico (B)



Caracterização físico-química da formulação desenvolvida

Após a seleção do material vegetal e desenvolvimento da formulação, foi avaliado os parâmetros físicos-químicos da solução. A Tabela 8 mostra os resultados da análise comparativa dos valores de pH e densidade (g/cm^3) das soluções testadas. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas em relação ao pH ($p = 0,002$) e à densidade ($p = 0,003$). A formulação sem extrato apresentou pH (média = 7,720; DP = 0,882) maior comparada à formulação com extrato (média = 5,463; DP = 0,398) e ao extrato líquido, sem excipientes (média = 4,865; DP = 0,003). Além disso, constatou-se que a formulação com extrato apresentou densidade (média = 1,0061; DP = 0,0017) maior comparada à formulação sem extrato (média = 1,0019; DP = 0,0003) e ao extrato líquido, sem excipientes (média = 1,0020; DP = 0,0001). Estes resultados são esperados devido à adição de compostos diferentes a formulação, o que irá influenciar nos parâmetros analisados.

Tabela 8 - Análise comparativa dos valores de pH e densidade (g/cm^3) das soluções testadas.

Variáveis	Formulação SEM extrato	Formulação COM extrato	Extrato líquido	p-valor
pH				0,002
Média	7,720 ^A	5,463 ^B	4,865 ^B	
DP	0,882	0,398	0,003	
CV	11,4%	7,3%	< 1%	
Densidade (g/cm^3)				0,003
Média	1,0019 ^B	1,0061 ^A	1,0020 ^B	
DP	0,0003	0,0017	0,0001	
CV	< 1%	< 1%	< 1%	

Nota. DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação. Letras diferentes denotam resultados significativamente diferentes ao nível de $p < 0,05$; Letras maiúsculas comparam valores na horizontal.

Caracterização térmica

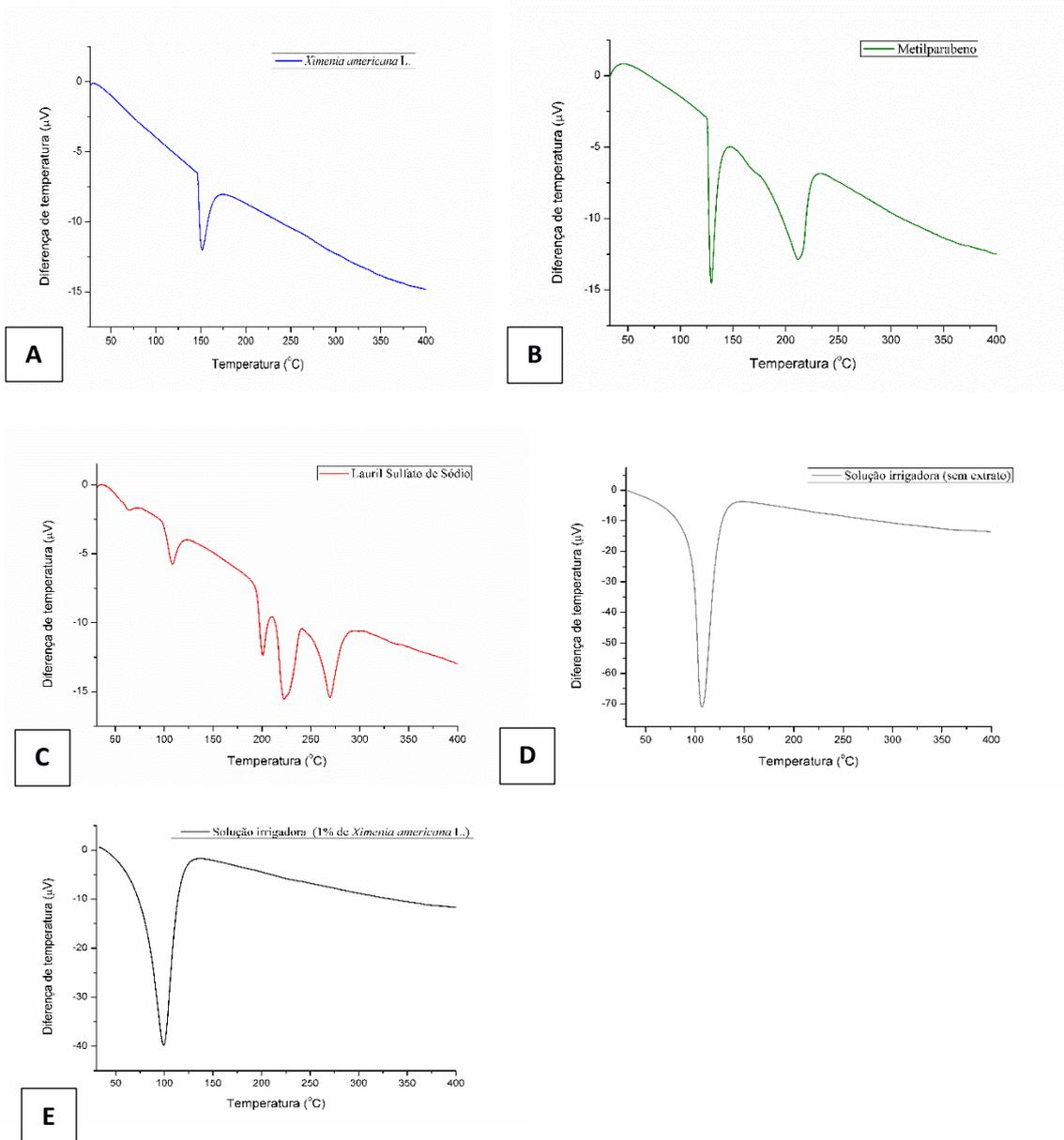
As curvas DTA do extrato vegetal e dos excipientes estão dispostas na figura 2. Na curva de *Ximenia americana* L. há a presença de apenas um pico endotérmico em 151,49°C, provavelmente relacionado ao início do processo de decomposição (SANTANA et al., 2018). O metilparabeno apresentou dois picos endotérmicos, em temperaturas superiores 100°C, enquanto o lauril éter sulfato de sódio apresentou cinco picos endotérmicos (tabela 9). Quando feita a análise da curva da solução intracanal desenvolvida, pode-se observar que

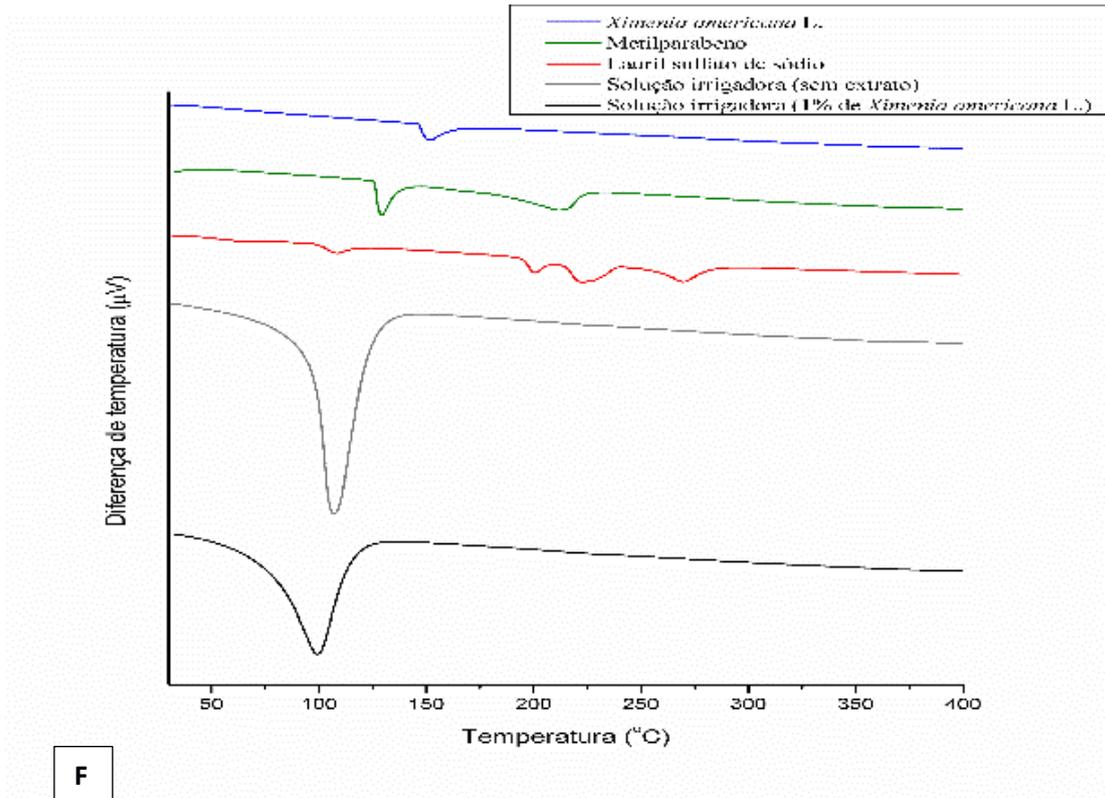
houve supressão dos picos isolados dos excipientes e aparecimento de apenas um pico em temperatura de 99,13°C. Isto provavelmente se deve a baixa concentração dos constituintes da formulação e alta concentração de conteúdo aquoso e sua evaporação. Este mesmo pico também foi observado na solução sem *X. americana* L., o que sugeri que o extrato vegetal não interfere na formulação. Assim estudos de caracterização térmica e aplicação de técnicas analíticas do extrato vegetal de *X. americana* L. já tem sido realizados, sendo importante ferramenta que pode ser utilizada pela industria farmacéutica para verificação de excipientes incompatíveis com o extrato vegetal, a exemplo da lactose, amido e estearato de magnésio, em formulações sólidas (FERNANDES et al., 2013; SANTANA et al., 2017).

Tabela 9 – Dados de DTA referentes às etapas de decomposição de *X. americana* L. (A), Metilparabeno (B), Laurilsulfato de sódio (C), Solução irrigadora com extrato vegetal (D), Solução irrigadora sem extrato vegetal (E).

Amostra	Pico 1		Pico 2		Pico 3		Pico 4		Pico 5	
	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	Pico (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
A	151,49	-173,33	-	-	-	-	-	-	-	-
B	129,32	-253,22	211,85	-457,57	-	-	-	-	-	-
C	65,01	-5,09	108,42	-81,42	200,82	-88,77	222,71	-277,00	269,55	-273,70
D	99,13	-3,44	-	-	-	-	-	-	-	-
E	107,07	-3,91	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 2 - Curvas DTA do extrato de *Ximenia americana* L. e excipientes da formulação. (A) *X. americana* L., (B) Metilparabeno, (C) Laurilsulfato de sódio, (D) Solução irrigadora sem extrato, (E) Solução irrigadora com extrato (F) sobreposição de todas curvas.





CONCLUSÃO

Com exceção da *Mormodica charantia* que foi ineficaz contra *Candida albicans* e do extrato de *Croton blanchetianus* Baill que também se mostrou praticamente ineficaz contra *Enterococcus faecalis*, todos os outros extratos exibiram atividade antimicrobiana em menor ou maior grau. *Ximenia americana* e *Schinopsis brasiliensis* se destacaram com melhores atividades para os microrganismos testados.

A caracterização fitoquímica revelou altos teores de polifenóis totais e taninos condensados o que possivelmente é responsável pela atividade antimicrobiana dos extratos estudados. Também foi observado que o extrato vegetal ao ser incorporado em formulações continua com sua atividade antimicrobiana, apesar da variação dos parâmetros físicos-químico. Sendo o marcador químico importante instrumento para o controle de qualidade do produto. Entretanto mais estudos são necessário para se validar a eficácia *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AKHALWAYA S.; VAN VUUREN S.; PATEL M. An *in vitro* investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, n. 1, p. 359-371, 2018.
- ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- APPEL, Gerson; REUS, Marcia. **Formulações aplicadas a odontologia**. 2ª edição. São Paulo: RCN editora, 2005.
- ARWEILER, NB; NETUSCHIL, L. The oral microbiota: microbiota of the human Body, advances in experimental medicine and biology. **Springer International Publishing**. Switzerland 2016.
- BORZINI, L. et al. Root canal irrigation: chemical agents and plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **The Open Dentistry Journal**, v. 10, p. 692-703, 2016.
- BRANDÃO, D.O. et al. Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, n. Article ID 7528297, p. 1-15, 2016.
- BRANDÃO, D.O. et al. Validation of UPLC method for determination of gallic acid from *Ximenia americana* L. **Planta Medica**, v.80, n.16, 2014.
- CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.11, p. 3583-3589, 2004.
- CHAVES, E. et al. Um olhar sobre *Ximenia americana* L. e suas potencialidades. **Acta tecnológica**, v 9, n 1, p.70-77, 2014.
- CHAVES, T.P. et al. Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 33, p. 843-849, 2015.

CHAVES, T.P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 847-853, 2013.

COSTA, E.M.M.B. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

DELBONI, M. et al. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 3, p. 377-382, 2017.

FERNANDES, F.H.A. et al. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 1, p. 208-211, 2015.

FERNANDES, F.H.A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 1, p. 443-447, 2013.

FREIRES, IA; ROSALEN, PL. How Natural Product Research has Contributed to Oral Care Product Development? A Critical View. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 6, p. 1311-1317, 2016.

HENRIQUES, LCF et al. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 8, p. 1239-1245, 2016.

JAGESSAR, R.C.; GOMES, G. An evaluation of the antibacterial and antifungal activity of leaf extracts of *Momordica charantia* against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nature Science**, vol. 8, n. 1, p. 1-14, 2008.

KOVAC, J. et al. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. **Bratislava Medical Journal**, v. 114, n. 12, p. 716-720, 2013.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística Aplicada**. 6. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2016.

LE, N. et al. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 858– 862, 2012.

LUCENA FILHO J.H.S. et al. Antimicrobial potential of *Momordica charantia* L. against multiresistant standard species and clinical isolates. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 16, n. 11, p. 854-858, 2015.

MAGASSOUBA, F.B. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 44-53, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 4, p. 613–621, 1993.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A3 NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**. Pensilvânia: NCCLS; 2008.

OGUNLEYE, D. S. e IBITOYE, S.F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

PRETEL, H. et al. Comparação entre soluções irrigadoras na endodontia: clorexidina x hipoclorito de sódio. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 1, p. 127-132, 2011.

SANTANA, C.P. et al. Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 603-617, 2018.

SANTOS, K.K.A. et al. Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 162-166, 2012.

SARDI, J.C.O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p.10-24, 2013.

SILVA, K.M.A. et al. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.14, n. 2, p. 92 – 98, 2015.

SILVA, M.S.P. et al. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. Article ID 681207, 6 pages, 2012.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições testadas, as plantas medicinais são importantes para bioprospecção de novos antimicrobianos.

A variação da concentração etanólica e dos métodos extrativos influenciam na atividade antimicrobiana dos extratos testados, assim como na quantificação dos metabólitos secundários;

Com exceção da *Mormodica charantia* que foi pouco eficaz contra *Candida albicans* e do extrato de *Croton blanchetianus* Baill que também se mostrou praticamente ineficaz contra *Enterococcus faecalis*, todos os outros extratos exibiram atividade antimicrobiana em menor ou maior grau. *Ximenia americana* L. e *Schinopsis brasiliensis* se destacaram com melhores atividades para os microrganismos testados.

A formulação com o extrato de *Ximenia americana* L. também apresentou atividade antimicrobiana para as cepas testadas;

Na caracterização fitoquímica revelou-se altos teores de polifenóis totais e taninos condensados, o que possivelmente é responsável pela atividade antimicrobiana dos extratos estudados.

A caracterização da formulação evidenciou variação nos parâmetros analisados (pH e densidade), mas os resultados são esperados devido a adição de compostos diferentes a formulação, o que irá influenciar nesses parâmetros.

Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação do extrato de *Ximenia americana* L. Assim como estudo em dentes humanos para avaliar a efetividade químico-mecânico da solução desenvolvida.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ferula gummosa* plant essential oil compared to NaOCl and CHX: a preliminary in vitro study. **Restorative dentistry and endodontics**, p. 50-57, 2014.
- ABBOTT, PV; YU, C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system. **Australian Dental Journal Supplement**, v. 52, n. 17-31, 2007.
- AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n.3, p. 325–354, 2007.
- ALMEIDA J, et al. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Indian Journal of Dental Research**, v. 29, n.3, 347-351, 2018.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL.** 2011. 86p.: il. Color. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde Tecnologia Rural. Patos – PB: UFCG, CSTR. 2011.
- APPEL, G.; REUS, M. **Formulações aplicadas a odontologia.** 2ª edição. São Paulo: RCN editora, 2005.
- AW, VINCENT. Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. **Australian Endodontic Journal**, v.42, p. 53-59, 2016.
- BASRANI, B; HAAPASALO, M. Update on endodontic irrigating solutions. **Endodontic Topics**, v. 27, p.74-102, 2012.
- BEDNARCZUK, V. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, p. 43-50. 2010.
- BERGENHOLTZ, G. Assessment of treatment failure in endodontic therapy. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 43, p. 753-758, 2016.

BELSTRØM, D. et al. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n.1, 2017.

BITU, V. et al. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 265–272, 2015.

BORZINI, L. et al. Root canal irrigation: chemical agents and plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **The Open Dentistry Journal**, v. 10, p. 692-703, 2016.

BRANDÃO, D.O. et al. Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, n. Article ID 7528297, p. 1-15, 2016.

BRASILEIRO, M. et al. *Ximenia americana* L.: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.

CÂMARA, A.C.; ALBUQUERQUE, M.M.; AGUIAR, C.M. Soluções irrigadoras utilizadas para o preparo biomecânico de canais radiculares. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v.10, n. 1, p. 127-133, 2010.

CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, J.A., VASCONCELOS, L.C., MACIEL, P.P., BRASIL, V.L.M. Brazilian scientific production on herbal medicines used in dentistry. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.16, n.3, p.618-627, 2014.

CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.11, p. 3583-3589, 2004.

CHAVES, E. et al. Um olhar sobre *Ximenia americana* L. e suas potencialidades. **Acta tecnológica**, v 9, n 1, p.70-77, 2014.

CHAVES, T.P. et al. Evaluation of the interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz extract and antimicrobials using biological and analytical models. **PLoS ONE**, v.11, n. 5, p. 1-23, 2016.

CHAVES, T.P. et al. Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl., v. 9, n. 33, p. 843-849, 2015.

COSTA, E et al. In vitro antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Revista Odonto Ciência**, v. 28, n. 4, p. 101-104, 2013.

DELBONI, M. et al. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 3, p. 377-382, 2017.

FRANCISCO, K. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde UnG**, v.4, n.1, p.18-24, 2010.

FREIRES, IA; ROSALEN, PL. How Natural Product Research has Contributed to Oral Care Product Development? A Critical View. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 6, p. 1311-1317, 2016.

GENERALI, L; et al. Effect of different irrigation systems on sealer penetration into dentinal tubules. **Journal of endodontics**, v. 43,n. 4, p. 652-665, 2017.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamento**. 2º edição, 2007 (2º reimpressão revisada 2008). Pharmabooks: São Paulo: SP.

GOMES, V. et al. Actividad antimicrobiana de productos naturales de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.4, p. 529-533, 2013.

GUIVARCH, M. et al. Sodium hypochlorite accident: A systematic review. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 1, p. 16-24, 2017.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine** v.27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HASENCLEVER, L. et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HENRIQUES, LCF. et al. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 8, p. 1239-1245, 2016.

IQBAL, A. Antimicrobial irrigants in the endodontic therapy. **International Journal of Health Sciences**, v. 6, n. 2, p. 186-192, 2012.

JAIN, P.; RANJAN, M. Role of herbs in root canal irrigation: a review. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 2, p. 06-10, 2014.

JAJU, S.; JAJU, PP. Newer root canal irrigants in horizon: a review. **International Journal of Dentistry**, v. 2011, Article ID 851359, 9 pages, 2011.

JIA, S. et al. Recent advances in *Momordica charantia*: functional components and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2555-2580, 2017.

KOVAC, J. et al. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. **Bratislava Medical Journal**, v. 114, n. 12, p. 716-720, 2013.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Fundamentos da metodologia científica**. 5ed. 2003.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística Aplicada**. 6. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2016.

LE, N. et al. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 858– 862, 2012.

LEE, L.W. et al. Bacteria in the apical root canals of teeth with apical periodontitis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 116, n. 6, 448-456, 2017.

LEONARDI, D.P. et al. Alterações pulpares e periapicais. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 8, n. 4, p. 47-61, 2011.

LEONARDO, Mario Roberto. **Endodontia tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2008. 720 p. 1v. il.

LIMA, COSMO RUFINO DE. **Parâmetros ecofisiológicos de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz e sua relação com a variabilidade temporal das chuvas em áreas do Semiárido paraibano**. Tese (Doutorado em agronomia). Areia: UFPB/CCA, 2014.

LIMA, R.F. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, Article ID 802696, 7 pages, 2014.

LUCENA FILHO J.H.S. et al. Antimicrobial potential of *Momordica charantia* L. against multiresistant standard species and clinical isolates. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 16, n. 11, p. 854-858, 2015.

LUIZE, P.S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MACEDO, J.G.F. et al. Analysis of the variability of therapeutic indications of medicinal species in the Northeast of Brazil: comparative study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, article ID 6769193, 28 pages, 2018.

MACHADO, Manoel Eduardo de Lima. **Endodontia: da biologia à técnica**. São Paulo: Santos, 2009. 488 p. il.

MAGASSOUBA, F.B. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 44-53, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 4, p. 613-621, 1993.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MISTRY K.S. et al. Comparative evaluation of antimicrobial activity of herbal extracts with 5.25% sodium hypochlorite against multispecies dental biofilm. **Saudi Endodontic Journal**, v. 6, n. 2, p. 71-76, 2016.

MISTRY, K.S. et al. The antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi*, *Tinospora cardifolia*, *Ocimum sanctum* and 2% chlorhexidine gluconate on common endodontic pathogens: An in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 8, n. 2, p. 172-177, 2014.

MOHAMMADI, Z; JAFARZADEH, H; SHALAVI, S. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine as a root canal irrigant: a literature review. **Journal of Oral Science**, v. 56, n. 2, p. 99-103, 2014.

MOHAMMADI, Z. et al. root canal irrigants and dentin bonding: An update. **Iranian Endodontic Journal**, v. 12, n. 2, p. 131-136, 2017.

MOREIRA, B.O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *schinopsis brasiliensis* engl. (anacardiaceae).** (Dissertação) Pós-Graduação em Química. UFBA, 2009. Salvador. 119p.

NAKAMURA, V.C. et al. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 3, p. 217-224, 2013.

NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A3 NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras.** Pensilvânia: NCCLS; 2008.

NEELAKANTAN, P. et al. Biofilms in endodontics: current status and future directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1748-1769, 2017.

OGUNLEYE, D. S. e IBITOYE, S.F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, C.L. et al. Atividade antimicrobiana do óleo de *copaifera officinalis* sobre bactérias do biofilme oral. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 1, p. 34-38, 2016.

OLIVEIRA, J.R. et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 208, p. 1-7, 2013.

PASHLEY, E. L. et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **Journal of endodontics**, v. 11, n. 12, p. 525 – 528, 1985.

PEREIRA, J.V. et al. Bacterial diversity in the saliva of patients with different oral hygiene indexes. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 4, p. 409-416, 2012.

PEREIRA, M.S.V. et al. **Plantas medicinais e produtos bioativos na odontologia**. João Pessoa: Editora do CCTA, 2016.

PODAR, R. et al. In vivo antimicrobial efficacy of 6% *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica*, and 3% sodium hypochlorite as root canal irrigants. **European Journal of Dentistry**, v. 9, n. 4, p. 529-534, 2015.

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. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 1, p. 83-86, 2010.

PRETEL, H. et al. Comparação entre soluções irrigadoras na endodontia: clorexidina x hipoclorito de sódio. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 1, p. 127-132, 2011.

RÔÇAS, IN; SIQUEIRA JR, JF. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 576-580, 2012.

ROCHA, E.A.L.S.S. et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 351-355, 2013.

SARDI, J.C.O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p.10-24, 2013.

SHIN, J.M. et al. Deciphering endodontic microbial communities by next-generation sequencing. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 7, p. 1080-1087, 2018.

SILVA, K.M.A. et al. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximania americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.14, n. 2, p. 92 – 98, 2015.

SILVA, M.S.P. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. Article ID 681207, 6 pages, 2012.

TEWARI R.K. et al. Role of herbs in endodontics. **Journal of Oral Research and Review**, v. 8, n. 2, p. 95-99, 2016.

TSEISIS, I. et al. Bacterial colonization in the apical part of extracted human teeth following root-end resection and filling: a confocal laser scanning microscopy study. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2017.

TZANETAKIS, G.N. et al. Comparison of bacterial community composition of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing. **Journal of endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1226-1233, 2015.

VALERA, M.C. et al. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 118-123, 2013.

VIDANA, R. et al. *Enterococcus faecalis* infection in root canals – host-derived or exogenous source?. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 109-115, 2010.

ZHANG, C. et al. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: A systematic review. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1207-1213, 2015.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 5, p. 389 – 398, 2006.

WANG, Q.Q. et al. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Journal of Oral Science**, v. 4, n. 1, p. 19-23, 2012.