

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

GUSTAVO LUCAS DA SILVA LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DE QUITOSANA COM**  
**CARVACROL PARA TRATAMENTO ENDODÔNTICO**

JUIZ DE FORA

2024

GUSTAVO LUCAS DA SILVA LIMA

**Desenvolvimento de um gel de quitosana com carvacrol para tratamento  
endodôntico**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de mestre em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadora: Profa. Dra. Lara Melo Campos

JUIZ DE FORA

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Silva Lima, Gustavo Lucas.

DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DE QUITOSANA COM CARVACROL PARA TRATAMENTO ENDODÔNTICO / Gustavo Lucas da Silva Lima. -- 2024.

110 p.

Orientadora: Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadora: Lara Melo Campos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Endodontia. 2. Medicação Intracanal. 3. Biofilmes. 4. Produtos naturais bioativos. 5. Monoterpenos. I. Fabri, Rodrigo Luiz, orient. II. Melo Campos, Lara, coorient. III. Título.

**Gustavo Lucas da Silva Lima**

**Desenvolvimento de um Gel de Quitosana com Carvacrol para Tratamento Endodôntico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 06 de setembro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Rodrigo Luiz Fabri** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Lara Melo Campos** - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dr. André Guimarães Machado**

Faculdade Soberana - Juiz de Fora

**Dra. Luciana Moreira Chedier**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 16/08/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Chefe de Departamento**, em 06/09/2024, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Moreira Chedier, Professor(a)**, em 06/09/2024, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **André Guimarães Machado, Usuário Externo**, em 06/09/2024, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Lara Melo Campos, Usuário Externo**, em 06/09/2024, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1928629** e o código CRC **10EF38B4**.

---

## RESUMO

As pesquisas em Endodontia visam aprimorar o tratamento de canal dentário, buscando também substâncias intracanais entre sessões, sendo a recolonização do canal por microrganismos como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus sp.* e *Candida albicans* um desafio na prevenção de reinfecção endodôntica e manutenção de lesões periapicais. O Carvacrol, extraído de óleos essenciais, é estudado por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Este estudo desenvolveu um gel intracanal à base de quitosana com carvacrol. Foram realizados ensaios MTT para citotoxicidade, espécies reativas de oxigênio (eROS) e dosagem de óxido nítrico (NO) para potencial antioxidante, concentração inibitória mínima (CIM) para atividade antimicrobiana, curva de crescimento microbiano, ação em envoltório celular e antibiofilme em diferentes fases do biofilme. A amoxicilina foi o controle positivo. Os resultados mostraram que carvacrol não foi citotóxico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e fibroblastos L929, exceto na concentração 300 µg/mL, mostrando atividade antioxidante a partir de 150 µg/mL pelo teste de dosagem de eROS e NO. A CIM de carvacrol foi entre 100 e 200 µg/mL, demonstrando eficácia antibiofilme mais acentuada em biofilmes pré-formados, com menor eficácia na fase de adesão. Na dosagem de NO, carvacrol demonstrou eficácia estatisticamente significativa a partir de 75µg/mL, propiciando uma queda de 33%. Carvacrol alterou as fases de crescimento bacteriano e aumentou a permeabilidade da membrana celular, promovendo maior liberação de nucleotídeos e proteínas em comparação à nistatina e amoxicilina. Nos testes de estabilidade, DMSO a 20% foi o solvente mais adequado pós-centrifugação. No ensaio de FTIR, foram identificadas interações intermoleculares entre o polímero e carvacrol. A análise antimicrobiana por difusão em disco mostrou formação de halos inibitórios, com diâmetros maiores conforme a concentração de carvacrol aumentava, aproximando-se do controle positivo na concentração mais alta.

**Palavras-chave:** Medicação intracanal. Carvacrol. Biofilme endodôntico. *Enterococcus sp.*

## ABSTRACT

Endodontic research aims to improve root canal treatment, focusing on strategies such as intracanal medication between sessions. The recolonization of the root canal system by microorganisms such as *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus sp.*, and *Candida albicans* presents a challenge in preventing endodontic reinfection and maintaining periapical lesions. Carvacrol, extracted from essential oils, is studied for its antimicrobial and antioxidative properties. This study develops a chitosan-based intracanal gel containing carvacrol. MTT assays for cytotoxicity, reactive oxygen species (eROS) assays, and nitric oxide (NO) quantification for antioxidant potential, minimum inhibitory concentration (CIM) for antimicrobial activity, microbial growth curves, cell envelope action, and antibiofilm activity at different stages of biofilm formation were performed. Amoxicillin was used as the positive control. The results showed that carvacrol was not cytotoxic to BALB/c mice peritoneal macrophages and L929 fibroblasts, except at a concentration of 300 µg/mL. Carvacrol demonstrated antioxidant activity starting at 150 µg/mL, as measured by ROS and NO assays. The MIC of carvacrol ranged from 100 to 200 µg/mL, with more pronounced antibiofilm activity in pre-formed biofilms and less efficacy during the adhesion phase. In the NO assay, carvacrol showed statistically significant efficacy starting at 75 µg/mL, resulting in a 33% reduction. Carvacrol altered bacterial growth phases and increased membrane permeability, leading to higher release of nucleotides and proteins compared to nystatin and amoxicillin. In stability tests, 20% DMSO was the most suitable solvent post-centrifugation. FTIR analysis identified intermolecular interactions between the polymer and carvacrol. Antimicrobial analysis by disk diffusion showed the formation of inhibitory halos, with larger diameters as the carvacrol concentration increased, approaching the positive control at the highest concentration.

**Keywords:** Intracanal medication. Carvacrol. Endodontic biofilm. *Enterococcus sp.*

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Representação tomográfica de lesão endodôntica                                                                                         | 15 |
| <b>Figura 2:</b> Representação de acesso endodôntico em elemento molar inferior com vista axial e sagital                                               | 15 |
| <b>Figura 3:</b> Representação de lima endodôntica em trabalho mecânico no interior do leito do canal radicular                                         | 17 |
| <b>Figura 4:</b> Etapas do preparo e realização da terapia fotodinâmica em dente extraído                                                               | 18 |
| <b>Figura 5:</b> Representação ilustrativa e radiográfica de obturação endodôntica                                                                      | 19 |
| <b>Figura 6:</b> Esquema representativo de mecanismo de ação de células odontoblásticas em resposta à agressão microbiológica                           | 21 |
| <b>Figura 7:</b> Imagem de MEV de biofilme em relação ao tempo                                                                                          | 23 |
| <b>Figura 8:</b> Cortes histológicos evidenciando microrganismos residuais após preparo químico-mecânico                                                | 25 |
| <b>Figura 9:</b> Microscopia óptica de polissacarídeo de biofilme tratado com HC antes e após 21 dias                                                   | 33 |
| <b>Figura 10:</b> Estrutura química do Carvacrol                                                                                                        | 38 |
| <b>Figura 11:</b> Viabilidade celular de macrófagos peritoneais após tratamento com carvacrol                                                           | 55 |
| <b>Figura 12:</b> Viabilidade celular de fibroblastos após tratamento com carvacrol                                                                     | 55 |
| <b>Figura 13:</b> Avaliação dos níveis intracelulares de eROS por espectrofluorimetria em macrófagos tratados com diferentes concentrações de carvacrol | 57 |
| <b>Figura 14:</b> Produção de NO por macrófagos após tratamento com carvacrol                                                                           | 60 |
| <b>Figura 15:</b> Curva de crescimento de carvacrol frente a <i>E. faecium</i> ATCC® 6569™                                                              | 66 |
| <b>Figura 16:</b> Curva de crescimento de carvacrol frente a <i>E. faecalis</i> ATCC® 19433™                                                            | 67 |
| <b>Figura 17:</b> Curva de crescimento de carvacrol frente a <i>S. oralis</i> ATCC® 10557™                                                              | 68 |
| <b>Figura 18:</b> Curva de crescimento de carvacrol frente a <i>C. albicans</i> ATCC® 10321™                                                            | 69 |
| <b>Figura 19:</b> Ação de carvacrol em envoltório celular de <i>E. faecium</i> ATCC® 6569™                                                              | 71 |
| <b>Figura 20:</b> Ação de carvacrol em envoltório celular de <i>E. faecalis</i> ATCC® 19433™                                                            | 72 |
| <b>Figura 21:</b> Ação de carvacrol em envoltório celular de <i>S. oralis</i> ATCC® 10551™                                                              | 73 |

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 22:</b> Ação de carvacrol em envoltório celular de <i>C. albicans</i> ATCC® 10321™ |    |
|                                                                                              | 74 |
| <b>Figura 23:</b> Efeito do carvacrol sobre biofilme na etapa de proliferação                | 76 |
| <b>Figura 24:</b> Efeito do carvacrol sobre biofilme na etapa de adesão                      | 77 |
| <b>Figura 25:</b> Espectros de infravermelho de carvacrol e gel 0%, gel 0,5% e gel 1%        | 81 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima                                                                                            | 63 |
| <b>Tabela 2:</b> Valores de halo de inibição dos controles e formulações para as linhagens de <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. oralis</i> e <i>C. albicans</i> | 83 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |                                                                  |
|------------------|------------------------------------------------------------------|
| AMP 95           | Aminometil propanol                                              |
| ATR              | Acessório de refletância total atenuada                          |
| BDs              | Beta-defensinas                                                  |
| Ca <sup>2+</sup> | Íons Cálcio                                                      |
| CAT              | Catalase                                                         |
| CBM              | Concentração bactericida mínima                                  |
| CFM              | Concentração fungicida mínima                                    |
| CHX              | Clorexidina                                                      |
| CIM              | Concentração inibitória mínima                                   |
| CLs              | Cristais lipídicos                                               |
| CSP              | Peptídeo estimulante de competência                              |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido                                                 |
| DP               | Desvio padrão                                                    |
| EPS              | Substâncias poliméricas extracelulares                           |
| eROS             | Espécies reativas de oxigênio                                    |
| FTIR             | Espectroscopia eletrônica vibracional na região do Infravermelho |
| GPx              | Glutathione peroxidase                                           |
| GR               | Glutathione reductase                                            |
| GSH              | Glutathione                                                      |
| GST              | Glutathione transferase                                          |
| H2DCFDA          | Diclorodihidrofluoresceína                                       |
| HC               | Hidróxido de Cálcio                                              |
| IFN- $\gamma$    | Interferon-gama                                                  |
| IL               | Interleucina                                                     |
| LPS              | Lipopolissacarídeo                                               |
| MDA              | Malondialdeído                                                   |
| MH               | Mueller-Hinton                                                   |
| MIC              | Medicação intracanal                                             |

|                                 |                                            |
|---------------------------------|--------------------------------------------|
| NaNO <sub>2</sub>               | Nitrito de sódio                           |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Carbonato de sódio                         |
| NaOCl                           | Hipoclorito de sódio                       |
| NaOH                            | Hidróxido de sódio                         |
| NK                              | Células natural killer                     |
| NO                              | Óxido nítrico                              |
| NO <sup>2-</sup>                | Nitritos                                   |
| OH <sup>-</sup>                 | Hidroxila                                  |
| PAMPs                           | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PMCC                            | Paramonocloroferol canforado               |
| PRRs                            | Receptores de reconhecimento de padrões    |
| SOD                             | Superóxido dismutase                       |
| TCFC                            | Tomografia computadorizada de feixe cônico |
| TNF-α                           | Fator de necrose tumoral                   |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                       |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                     | <b>13</b> |
| 2.1      | ENDODONTIA E CONCEITOS GERAIS .....                                                   | 13        |
| 2.2      | PERIAPICOPATIAS .....                                                                 | 19        |
| 2.3      | INFLAMAÇÃO E ENDODONTIA.....                                                          | 20        |
| 2.4      | BIOFILME E ENDODONTIA .....                                                           | 23        |
| 2.4.1    | <i>Enterococcus faecalis</i> .....                                                    | 27        |
| 2.4.2    | <i>Streptococcus oralis</i> .....                                                     | 28        |
| 2.4.3    | <i>Enterococcus faecium</i> .....                                                     | 29        |
| 2.4.4    | <i>Candida albicans</i> .....                                                         | 30        |
| 2.5      | HIDRÓXIDO DE CÁLCIO NO ÂMBITO DA ENDODONTIA.....                                      | 31        |
| 2.6      | QUITOSANA E ENDODONTIA.....                                                           | 34        |
| 2.7      | CARVACROL E ENDODONTIA.....                                                           | 37        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                 | <b>44</b> |
| 3.1.     | OBJETIVO GERAL .....                                                                  | 44        |
| 3.2.     | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                           | 44        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                       | <b>45</b> |
| 4.1.     | MATERIAIS DE ESTUDO .....                                                             | 45        |
| 4.2      | ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CARVACROL <i>IN VITRO</i> .....                                | 45        |
| 4.2.1    | Análise da citotoxicidade do carvacrol em macrófagos peritoneais e fibroblastos ..... | 45        |
| 4.2.2    | Avaliação da atividade antioxidante do carvacrol .....                                | 46        |
| 4.2.3    | Avaliação da atividade anti-inflamatória do carvacrol .....                           | 46        |
| 4.2.4    | Avaliação da atividade antimicrobiana do carvacrol .....                              | 47        |
| 4.2.5    | Concentração inibitória mínima (CIM) .....                                            | 48        |
| 4.2.6    | Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).....      | 49        |
| 4.2.7    | Curva de crescimento microbiano .....                                                 | 49        |
| 4.2.8    | Ação em envoltório celular .....                                                      | 50        |
| 4.2.9    | Avaliação da atividade antibiofilme.....                                              | 50        |
| 4.3      | PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA 1,0% (P/V).....                                        | 52        |
| 4.4      | DESENVOLVIMENTO DO GEL DE QUITOSANA CONTENDO CARVACROL.....                           | 52        |
| 4.4.1    | Teste preliminar de estabilidade.....                                                 | 52        |

|          |                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.2    | Espectroscopia eletrônica vibracional na região do Infravermelho (FTIR).....                     | 52        |
| 4.5      | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMULAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....                        | 53        |
| 4.5.1    | Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço ..... | 53        |
| 4.6      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                         | 53        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                          | <b>54</b> |
| 5.1.     | ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CARVACROL <i>IN VITRO</i> .....                                           | 54        |
| 5.2      | DESENVOLVIMENTO DO GEL DE QUITOSANA CONTENDO CARVACROL.....                                      | 77        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                           | <b>84</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                         | <b>85</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A endodontia é um ramo da odontologia dedicado ao estudo e tratamento do sistema de canais radiculares e, tem evoluído consideravelmente ao longo dos anos. A microbiota presente no interior dos canais radiculares infectados representa um desafio significativo, sendo importante o desenvolvimento de estratégias eficazes para seu controle. Neste sentido, a medicação intracanal (MIC) desempenha um papel não apenas na contribuição para eliminação de microrganismos, mas também a prevenção de complicações associadas, como inflamação e dor (Prada *et al.*, 2019).

Infecções endodônticas possuem elevada prevalência, sendo considerada uma preocupação global que acomete milhões de indivíduos (Tibúrcio-Machado *et al.*, 2021). Dessa maneira, estudos epidemiológicos destacam a diversidade microbiológica encontrada nos canais radiculares, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e vírus. Essa variabilidade demanda abordagens terapêuticas abrangentes e eficientes (Tibúrcio-Machado *et al.*, 2021).

No contexto da instrumentação mecânica e da irrigação durante a terapêutica, limitações são encontradas na erradicação total da microbiota, apresentando cerca de 40 a 60% dos canais infectados mesmo após esses procedimentos. Assim, preconiza-se a utilização de MIC dotadas de propriedades antimicrobianas entre as sessões para melhorar a eficácia do processo de infecção (Memon *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2023). Hidróxido de cálcio (HC) destaca-se como o agente tradicional utilizado há décadas e fortemente respaldado na literatura, sendo ainda reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e para controle de dor (Ibrahim *et al.*, 2020). Embora seus efeitos benéficos sejam significativos, existem limitações a serem consideradas. Dentre elas, destaca-se a capacidade limitada de controle do biofilme e preenchimento tridimensional limitado de irregularidades da anatomia interna, necessitando de altas concentrações por tempo prolongado para a bioatividade ser avaliada (Cosan *et al.*, 2022; Barbosa-Ribeiro *et al.* (2018).

Além do HC, outras substâncias são utilizadas como MIC mediante suas respectivas indicações, como o paramonoclorofenol canforado (PMCC), formocresol e tricresol formalina, podendo ser utilizado em associação com o HC como veículos biologicamente ativos. Entretanto, seus potenciais efeitos mutagênicos, carcinogênicos, citotóxicos, bioatividade limitada e tempo de atividade curto são alvos de debates constantes (Subramanyam *et al.*, 2017; Somasundaram *et al.*, 2020).

A utilização de produtos naturais bioativos com possível aplicabilidade na endodontia tem sido alvo de pesquisas, demonstrando resultados satisfatórios nas avaliações de potencial antimicrobiano e anti-inflamatório, contribuindo com a remissão de lesões periapicais, controle microbiológico intracanal no intervalo entre as sessões e dispondo de baixa citotoxicidade (Subramanyam *et al.*, 2017; Almadi *et al.*, 2018). Dentre eles, destaca-se o carvacrol e a quitosana (El-Hack *et al.*, 2020).

O carvacrol é um monoterpene encontrado, dentre outras espécies, no óleo essencial do *Origanum vulgare*, *Nigella sativa*, *Corido thymus* e *Lippia sidoides*, com estudos relatando atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias promissoras, possuindo baixa citotoxicidade. (Alvarenga *et al.*, 2016; Mechmechani *et al.*, 2022). Em contrapartida, a quitosana é um copolímero obtido através da desacetilação alcalina da quitina, podendo ser utilizada, dentre outras formas, como veículo gel, possuindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, podendo ser incorporado com outras substâncias (Bedian *et al.*, 2017; Muxika *et al.*, 2017).

A literatura consultada permite afirmar que a utilização concomitante do carvacrol associado à quitosana, especialmente na confecção de nanoestruturados e filmes com fins bioativos, evidenciando resultados satisfatórios e sinérgicos na otimização de suas propriedades (Bernal-Mercado *et al.*, 2022; Akhlaq *et al.*, 2023a; Akhlaq *et al.*, 2023b). Entretanto, ainda não há na literatura estudos publicados que avaliaram a bioatividade e potencial aplicabilidade da associação entre as substâncias supracitadas na forma de gel à otimização da terapia endodôntica.

Diante disso, sabendo da complexidade do processo de cura de infecções persistentes endodônticas e do potencial farmacológico do carvacrol e quitosana, a hipótese do presente trabalho é de que géis de quitosana incorporados com carvacrol, que detém multifuncionalidades bioativas, podem ser utilizados no tratamento endodôntico devido à sua ação antimicrobiana, tanto do composto sintético, quanto dos biopolímeros géis.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENDODONTIA E CONCEITOS GERAIS

A endodontia, um ramo da odontologia, dedica-se ao estudo detalhado da morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária humana, incluindo os tecidos adjacentes à raiz. Sua atuação é profunda, combinando ciência e prática clínica, concentrando-se na compreensão da fisiologia e biologia da polpa. O objetivo primordial é estabelecer a causa, realizar diagnósticos precisos e implementar medidas preventivas e tratamentos adequados para lesões que possam afetar a polpa e os tecidos perirradiculares (AAE, 2020).

Resumidamente, o tratamento endodôntico inicia-se após a confirmação radiográfica e clínica da colonização bacteriana ou agressão à polpa, sendo sintomas clínicos mais comuns a sensação de aumento do dente, dor intermitente que pode ser desencadeada por estímulos térmicos. Em alguns casos, pode não haver manifestação sintomática aparente (Karamifar, 2020).

Em termos histológicos, a polpa dentária é categorizada como um tecido conjuntivo desprovido de microbiota comensal, sendo protegida por camadas minerais. É importante notar que lesões e agressões que afetam partes mais profundas do dente, como cárie ou trauma, e exposições da câmara pulpar por diversos motivos, resultam em inflamação e quebra da esterilidade, elevando as chances de necrose do tecido vasculonervoso pulpar e facilitando a colonização microbiana, especialmente com a perda do suprimento sanguíneo (Xie *et al.*, 2021).

Em resposta a agressões microbiológicas, sinais inflamatórios contribuem para a necrose tecidual (Duncan, 2022). Nos canais infectados, microrganismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos desempenham papel importante para a manutenção da doença, juntamente com subprodutos metabólicos (Cardoso *et al.*, 2019). Evidências indicam que o tratamento mais eficaz contra a progressão é o tratamento endodôntico não cirúrgico, destacando que a resposta autônoma e/ou o uso de antibióticos sistêmicos não são suficientes (Leonardo *et al.*, 2012; Duncan, 2022).

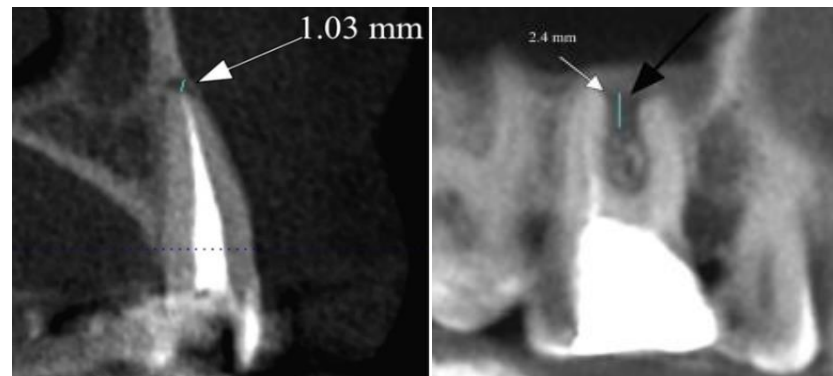
Na terapia endodôntica, a remoção completa da polpa contaminada é um destaque, tornando-se desafiador em polpas necrosadas com lesões, como a periodontite apical, uma doença inflamatória de progressão lenta ao redor do ápice dentário. A presença dessa condição é determinante para o sucesso após a terapia endodôntica, tendo em vista que elementos sem periodontite apical alcançam taxas

de sucesso entre 85% e 94%, enquanto elementos com periodontite apical apresentam taxas de sucesso entre 74% e 82% (NG *et al.*, 2008; Karamifar, 2020). Doenças periapicais de maior maturação infecciosa incluem lesões com diâmetro igual ou superior a 5mm, acometimento do trato sinusal e perfurações no terço médio e/ou coronal da raiz (Baseri *et al.*, 2023; Estrela *et al.*, 2014).

Com menor prevalência, os cistos periapicais, identificados radiograficamente, são caracterizados por estar ao redor do ápice dentário, exibindo borda cortical definida, formato circular ou curvo, estrutura interna radiolúcida, e possível deslocamento ou reabsorção das raízes (Karamifar, 2020; Venskutonis *et al.*, 2015). Em contraste, abscessos periapicais compartilham semelhanças com granulomas e cistos, tornando a diferenciação desafiadora. A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) fornece informações adicionais, especialmente em casos de cirurgia ou perfuração cortical evidentes, detectando edema, embora as fases iniciais dos abscessos periapicais possam não exibir características distintivas (Karamifar, 2020; Venskutonis *et al.*, 2015). Além disso, a análise radiográfica inicial permite um planejamento preciso, avaliando variabilidades anatômicas em duas dimensões, diâmetro pulpar, nódulos e a distância entre a corno da câmara pulpar e a cúspide como referência (Karamifar, 2020).

A análise histopatológica, embora seja a abordagem definitiva para distinguir radiolucências periapicais de origem endodôntica, é raramente realizada, já que, em geral, essas condições podem ser resolvidas por tratamento endodôntico não hospitalar. A diferenciação entre granulomas e cistos nem sempre é crucial, pois o tratamento para essas lesões envolve abordagem do canal radicular, cirurgia perirradicular ou terapêutica, podendo incluir uma combinação dessas modalidades (Karamifar, 2020; Venskutonis *et al.*, 2015).

**Figura 1: Representação tomográfica de lesão endodôntica**



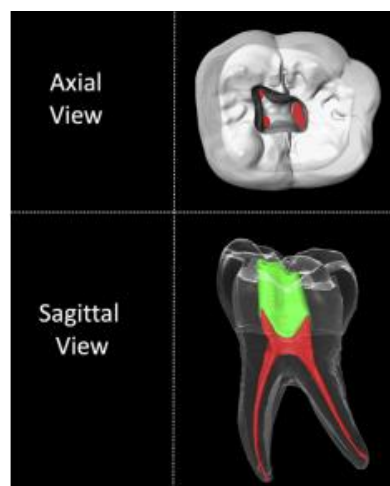
Fonte: Adaptado de Venskutonis *et al.*, 2014.

Legenda: As setas representam a localização tomográfica e o diâmetro da lesão

No estágio denominado "acesso endodôntico", realizado após avaliação radiográfica, utilizam-se brocas acopladas a motores para remover o tecido mineral e/ou infectado que reveste a câmara pulpar, permitindo a identificação dos canais radiculares. Durante esta etapa, a execução correta proporciona uma visualização clara dos canais radiculares, permitindo ao profissional tratar adequadamente estruturas como tecido pulpar infectado, realizar a higienização, desinfecção e modelagem dos canais, prevenindo complicações futuras (Shabbir *et al.*, 2021).

Esta etapa deve garantir uma visualização clara, controle preciso e prevenção de danos a estruturas vizinhas, especialmente pela presença de complexidades anatômicas nos canais e a necessidade da remoção completa do tecido infectado, que são desafios a serem considerados (Shabbir *et al.*, 2021; Connert *et al.*, 2022; Ricucci *et al.*, 2019).

**Figura 2: Representação de acesso endodôntico em elemento molar inferior com vista axial e sagital**



Fonte: Adaptado de Connert *et al.*, 2022.

Após a conclusão do acesso endodôntico, inicia-se a fase de instrumentação dos canais, que engloba o pré-alargamento. Nessa etapa, alargadores ou limas são utilizados, variando sua conicidade a cada milímetro linear, para promover o desgaste controlado da dentina interna dos canais, especialmente no terço médio-cervical dos dentes (Kwak *et al.*, 2021).

Na fase de instrumentação, ocorre o preparo químico-mecânico dos canais, utilizando limas e substâncias antimicrobianas, desempenhando um papel crucial ao remover detritos, reduzindo a carga bacteriana nos canais. A substância utilizada deve apresentar propriedades como capacidade de dissolver tecidos orgânicos, eliminar microrganismos, lubrificar o canal, quelar íons e suspender detritos, propriedades que podem ser oferecidas pelo Hipoclorito de Sódio (NaOCl) e/ou Clorexidina (CHX) (Boutsioukis *et al.*, 2022).

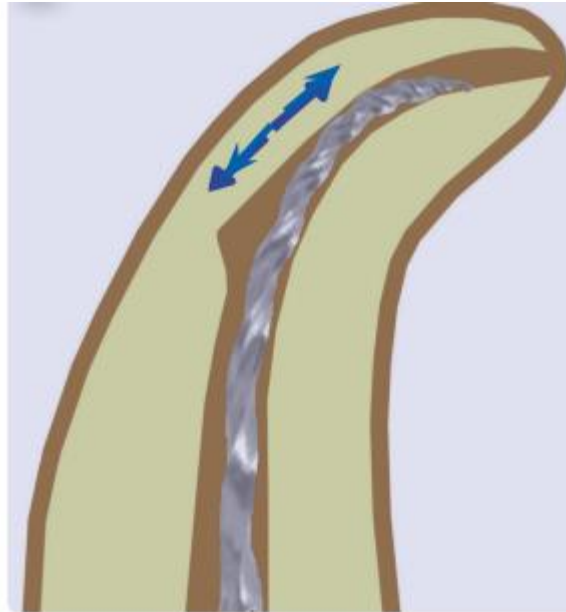
A irrigação do canal radicular para remoção de detritos e erradicação de bactérias é influenciada por vários fatores, incluindo a profundidade de penetração da agulha, diâmetros do canal radicular e da agulha, pressão da irrigação, viscosidade do irrigante, velocidade do fluxo do irrigante e tipo de bisel da agulha (Boutsioukis *et al.*, 2022). Em casos complexos, como anatomia apical complicada, a limpeza efetiva pode exigir adjuvantes químicos, como o NaOCl, normalmente utilizado como padrão de referência na concentração de 2,5% ou 5,25 na irrigação endodôntica (Gonçalves *et al.*, 2016).

O NaOCl possui diversos efeitos durante a irrigação endodôntica, atuando como solvente ao reagir com tecidos orgânicos, liberando cloro que forma cloraminas, degradando aminoácidos e promovendo saponificação. Sua estabilidade e atividade dependem do pH, sendo mais ativo em meio ácido, possuindo também efeito antimicrobiano pela oxidação e rompimento de membranas celulares, levando à peroxidação lipídica e danos à integridade celular do microrganismo (Petridis *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2020).

Em contrapartida, a CHX também é amplamente utilizada na endodontia, especialmente o gel a 2%, que oferece benefícios como lubrificação, redução do atrito e remoção de resíduos (Gonçalves *et al.*, 2016). Com pH estável entre 5 e 8, sua eficácia antimicrobiana é otimizada entre 5,5 e 7 (Bernardi *et al.*, 2015), sendo considerada uma alternativa ao NaOCl por sua baixa citotoxicidade, preservação periapical e aderência tecidual, além de sua ação antimicrobiana (Bernardi *et al.*, 2015).

A interação da CHX com membranas celulares envolve ligação a fosfolipídios, aumentando a permeabilidade e inibindo enzimas bacterianas, enquanto as limas desempenham papel crucial na remoção de tecido pulpar, detritos e calcificações dos canais, além de modelar e preparar os canais para o preenchimento subsequente com material obturador (Pirani *et al.*, 2022).

**Figura 3: Representação de lima endodôntica em trabalho mecânico no interior do leito do canal radicular**



Fonte: Adaptado de Bhuva *et al.*, 2020.

Legenda: As setas representam uma lima endodôntica em preparo mecânico no interior do canal radicular

Aprimorar a desinfecção de canais secundários durante e/ou após a instrumentação endodôntica é alcançado com terapia fotodinâmica, agitação do líquido irrigante e gestão precisa do tempo de contato com a superfície dentinária. A terapia fotodinâmica, combinada com luz apropriada e substância fotossensibilizadora, gera eROS com propriedades antimicrobianas (Plotino *et al.*, 2018), enquanto a agitação do líquido irrigante, seja por ultrassom ou dispositivos ultrassônicos, melhora a disseminação nos canais, removendo biofilme e microrganismos (Urban *et al.*, 2017). O gerenciamento adequado do tempo de contato do líquido também otimiza o efeito antimicrobiano, assegurando interação suficiente com os microrganismos (Virdee *et al.*, 2020).

**Figura 4: Etapas do preparo e realização da terapia fotodinâmica em dente extraído**



Fonte: Adaptado de Stájer *et al.*, 2020.

Exemplificação de algumas das etapas da terapia fotodinâmica na endodontia em elemento dentário extraído.

Para finalizar o tratamento endodôntico, realiza-se a obturação, preenchendo o interior do dente após a remoção da polpa infectada ou inflamada. A técnica visa preencher o sistema de canais radiculares para manutenção do preparo química-mecânico, utilizando materiais como a guta-percha e os cimentos endodônticos (Siqueira *et al.*, 2015). A guta-percha, flexível e biocompatível, adapta-se às paredes do canal, enquanto os cimentos endodônticos preenchem os espaços entre a guta-percha e as paredes do canal, garantindo uma vedação adequada (Pirani *et al.*, 2022).

A guta-percha é essencial na endodontia devido a suas propriedades vantajosas, como biocompatibilidade, baixa solubilidade e estabilidade ao longo do tempo, além de sua plasticidade permitir adaptação às paredes do canal, preenchendo irregularidades e fissuras, enquanto sua radiopacidade facilita a visualização em radiografias (Cheng *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2016).

Na obturação endodôntica, a guta-percha desempenha um papel central, garantindo um selamento eficaz dos canais radiculares. O processo envolve o uso de cones pré-fabricados, aquecimento da guta-percha para torná-la maleável e sua inserção no canal por meio de técnicas como condensação lateral ou compactação vertical, assegurando um selamento tridimensional (Camilleri, 2015).

Por outro lado, o cimento obturador endodôntico apresenta diversas funções associados e características benéficas pois, além de promover o selamento dos canais, evitando a entrada de bactérias e a contaminação, também contribui para a manutenção da saúde periapical devido às propriedades antimicrobianas, auxiliando no controle da infecção endodôntica (Kelmendi *et al.*, 2022). Uma função adicional do cimento obturador é sua habilidade de preencher os espaços vazios dentro do dente após a remoção da polpa dentária, criando uma barreira física que impede a penetração de fluidos e microrganismos, contribuindo assim para a longevidade e estabilidade do tratamento endodôntico (Cheng *et al.*, 2014).

O cimento utilizado como obturador endodôntico deve possuir propriedades físicas e químicas adequadas, incluindo consistência para facilitar a manipulação e inserção no canal radicular, assegurando distribuição uniforme (Candeiro *et al.*, 2019). Quanto à composição, pode variar, incorporando materiais como resinas, cerâmicas ou biocerâmicas, conferindo propriedades adicionais como resistência mecânica e adesão à dentina (Candeiro *et al.*, 2019; Camilleri *et al.*, 2015).

Durante este processo é imprescindível adotar precauções para assegurar a excelência do resultado obtido, como por exemplo, realizar uma limpeza minuciosa do canal radicular, removendo devidamente todo o tecido pulpar e quaisquer resíduos existentes durante a instrumentação. Além disso, assegurar uma adaptação precisa da obturação às paredes do canal, evitando a formação de espaços vazios que poderiam possibilitar a entrada de bactérias patogênicas (Kalantar Motamedi *et al.*, 2021).

**Figura 5: Representação ilustrativa e radiográfica de obturação endodôntica**



Fonte: Adaptado de Kalantar Motamedi *et al.*, 2021 e Bhuvu *et al.*, 2020.

## 2.2 PERIAPICOPATIAS

As lesões ao redor do ápice dentário são resultado de um processo defensivo do corpo para conter a disseminação e instalação de microrganismos nos tecidos adjacentes, podendo os microrganismos induzirem a periodontite de forma primária ou secundária, resistindo a tratamentos iniciais. A penetração dessas barreiras por patógenos endodônticos é limitada, mas produtos microbianos e toxinas podem iniciar e estabelecer a patose perirradicular (Karamifar *et al.*, 2020), fazendo com que haja reabsorção da cortical óssea, e promovendo substituição da mesma por tecido granulomatoso com uma parede densa de leucócitos polimorfonucleares. De forma menos comum uma camada epitelial pode estar presente no forame apical, impedindo

a penetração de microrganismos nos tecidos extra-radiculares (Kirchhoff; Viapiana *et al.*, 2013).

Radiograficamente, a radiolucidez ao redor do ápice é o sinal clínico mais comum dessas lesões, que podem ser definidas como granulomas, cistos ou abscessos, todos radiolúcidos em exames de imagem (Karamifar, 2020). Após tratamentos endodônticos minuciosos e não cirúrgicos, a maioria das lesões periapicais tende a se recuperar, sendo recomendado um período de observação de pelo menos 6 a 12 meses para avaliar o potencial de cicatrização (Baseri *et al.*, 2023). Estudos indicam que, na consulta de 6 meses, apenas metade dos casos que eventualmente se curam mostra sinais de cicatrização avançada e completa; no intervalo de 12 meses, cerca de 88% dessas lesões exibem sinais de cicatrização, embora a cicatrização completa possa levar até quatro anos em alguns casos (Karamifar, 2020).

Do ponto de vista morfológico, o sistema de canais radiculares possui uma estrutura complexa, impondo limitações significativas no combate ao biofilme quando não está no canal principal, pois essas limitações são impostas pelo uso de instrumentos mecânicos, como limas durante o tratamento (Siqueira Junior *et al.*, 2018). Contudo, a presença de ramificações e canais acessórios representam uma questão clínica relevante, pois essas áreas podem abrigar substratos orgânicos e microrganismos, contribuindo para a manutenção de um processo inflamatório após o tratamento endodôntico. A melhor limpeza possível seguida de vedação adequada dos canais acessórios é essencial para controlar o crescimento bacteriano e evitar a difusão de subprodutos através do ápice (Siqueira Junior *et al.*, 2018).

A complexidade anatômica do sistema de canais radiculares dificulta o controle da infecção microbiana durante o preparo, exigindo uma abordagem que combine a ação mecânica dos instrumentos com a ação antimicrobiana de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís, que podem ser utilizadas entre as sessões do tratamento (Duque *et al.*, 2018).

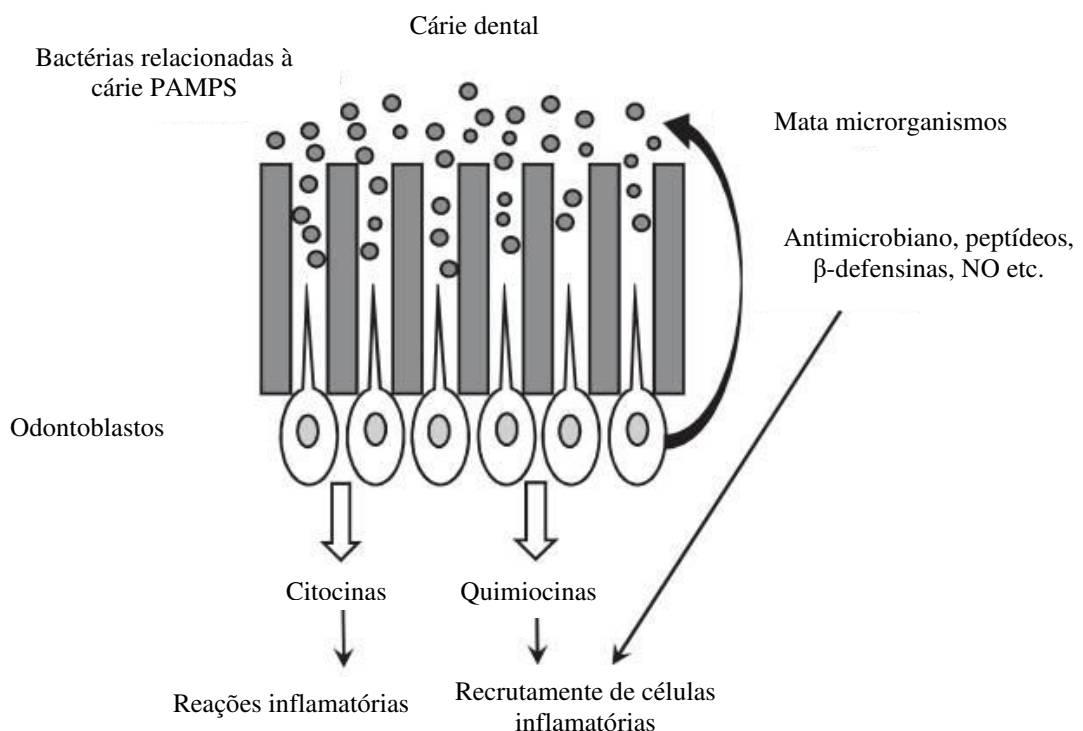
## 2.3 INFLAMAÇÃO E ENDODONTIA

Os odontoblastos desempenham um papel crucial no combate à invasão bacteriana e na ativação da imunidade na polpa dentária, reconhecendo patógenos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs) (Farges *et al.*, 2015; Galler *et al.*, 2021). Os receptores TLR2 e TLR4, presentes nos odontoblastos, reconhecem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, ativando a imunidade inata e regulando a expressão de antimicrobianos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Yumoto *et al.*, 2018; Galler *et al.*, 2021; Farges *et al.*, 2015).

Os odontoblastos também produzem agentes antibacterianos, como as beta-defensinas (BDs) e o óxido nítrico (NO). As BDs, especialmente o BD-2, têm amplo espectro antimicrobiano e efeito pró-inflamatório, regulando a expressão de citocinas como IL-6 e IL-8 e atraindo células do sistema imunológico, como células dendríticas, macrófagos, células T CD4+ de memória e células natural killer (Farges *et al.*, 2015; Galler *et al.*, 2021; Yumoto *et al.*, 2018). Essa interação pode resultar em um mecanismo de *feedback* positivo entre as citocinas inflamatórias e as BDs, contribuindo para a resposta imunológica na polpa dentária.

**Figura 6: Esquema representativo de mecanismo de ação de células odontoblásticas em resposta à agressão microbiológica**



Fonte: adaptado de Yumoto *et al.*, 2018.

A compreensão atual da fisiopatologia da polpa dentária e seus mecanismos de defesa valida estudos iniciais que evidenciaram sua capacidade de recuperação quando a agressão é removida em estágios iniciais reversíveis. As células fibroblásticas, abundantes na polpa, desempenham um papel importante nesse

processo, sendo as únicas células não imunes capazes de ativar o sistema complemento (Yumoto *et al.*, 2018; Galler *et al.*, 2021).

Além dos fibroblastos, as células-tronco da polpa dentária adulta também contribuem significativamente para o potencial regenerativo, especialmente em dentes permanentes maduros. A ativação do complemento pelos fibroblastos pulpares não apenas possui um notável potencial anti-inflamatório, mas também contribui para a regeneração tecidual ao recrutar progenitores pulpares (Yumoto *et al.*, 2018).

Os fibroblastos pulpares também induzem a lise direta de bactérias cariogênicas em estágios iniciais, e as quimiocinas liberadas do tecido pulpar lesionado desempenham um papel crucial ao atrair células-tronco mesenquimais da polpa dentária. Estas células podem diferenciar-se em células semelhantes a odontoblastos, promovendo a formação de dentina reparadora. As células-tronco da polpa dentária também sintetizam e liberam peptídeos antimicrobianos, contribuindo para a defesa eficaz contra agentes patogênicos (Farges *et al.*, 2015; Yumoto *et al.*, 2018; Galler *et al.*, 2021).

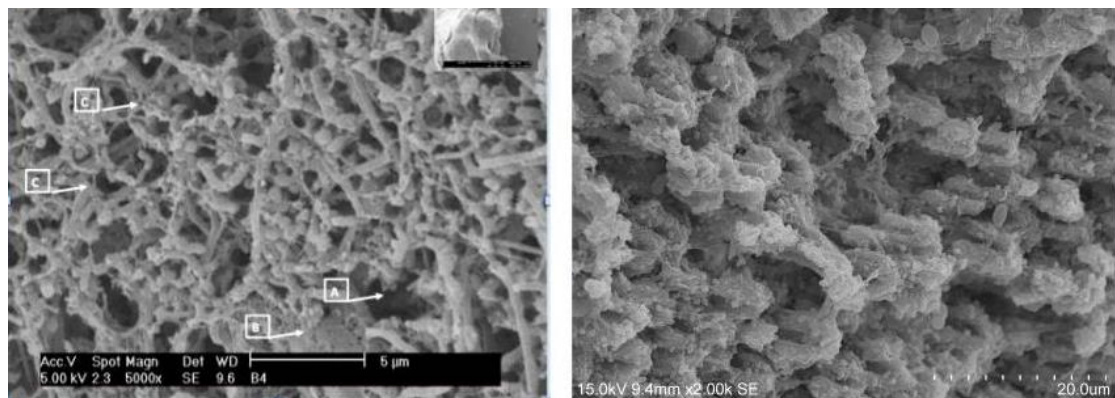
Durante o tratamento, ocorre a deterioração dos odontoblastos, resultando no fechamento dos túbulos dentinários e na formação de uma dentina mais rígida e seca. Isso interrompe a função vital dos odontoblastos, reduzindo a resposta a estímulos prejudiciais, uma vez que essas células não estão mais ativamente envolvidas na síntese de colágeno para reparo e proteção do tecido dentinário (Lopes *et al.*, 2015).

Microvascularmente, em reação a um estímulo nocivo na dentina (tecido mineralizado nos dentes, situado entre o esmalte e a polpa, compreendendo a maior parte da estrutura dentária), como contaminação, os odontoblastos aumentam a produção de colágeno para compensar a perda. Simultaneamente, as mitocôndrias dos odontoblastos requerem mais energia (oxigênio) para esse processo, desencadeando vasodilatação em arteríolas e vênulas, mediada por elementos do controle neural intrínseco que geram essa resposta. A inflamação resultante amplifica o influxo de água para a substância amorfa da polpa, exercendo pressão sobre a parede externa das arteríolas e vênulas. Importante observar que as paredes das arteríolas, sendo mais rígidas que as das vênulas, podem restringir a capacidade das vênulas de captar e redirecionar o dióxido de carbono aos pulmões, contribuindo para o aumento da acidez interna, intensificando a nocicepção e a inflamação no tecido pulpar (Lopes *et al.*, 2015; Farges *et al.*, 2015).

## 2.4 BIOFILME E ENDODONTIA

Um biofilme representa uma estrutura altamente organizada que engloba células bacterianas envolvidas por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida, aderida a uma superfície, podendo ser interpretado como uma camada de aglomeração da microbiota ou uma comunidade originada de microrganismos. É constituído por células permanentemente ligadas a um substrato ou interface, imersas em uma matriz composta por polissacarídeos, eDNA e proteínas extracelulares. A composição específica do biofilme varia conforme os microrganismos e os nutrientes disponíveis, resultando em organismos que apresentam um fenótipo modificado em termos de taxa de crescimento e transcrição gênica (Neelakantan *et al.*, 2017).

**Figura 7: Imagem de MEV de biofilme em relação ao tempo**



Fonte: Neelakantan *et al.*, 2017.

Legenda: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de comunidades bacterianas diferentes após cerca de 3 semanas de sua instalação

As células bacterianas fixas (sésseis), encontradas em biofilmes, apresentam notáveis diferenças em relação às células bacterianas móveis em estado planctônico, principalmente no que tange às propriedades fisiológicas distintas das bactérias em biofilmes, destacando-se a proteção conferida pela matriz circundante. Essa matriz resguarda-os contra estresses ambientais (Caggianiello *et al.*, 2016).

É relevante observar que os microrganismos constituintes dos biofilmes podem ser até 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro em comparação com as células planctônicas. Adicionalmente, as células bacterianas apresentam um crescimento mais lento nos biofilmes, quando comparadas ao estado planctônico, resultando em uma absorção mais gradual de agentes antimicrobianos. Além disso, o ambiente do biofilme propicia a acumulação

de mutações nas células microbianas, contribuindo ainda mais para a sobrevivência e persistência desses microrganismos (Neelakantan *et al.*, 2017).

A composição bacteriana inicial do canal radicular é predominantemente composta por aeróbios e anaeróbios facultativos (Antunes *et al.*, 2015). É possível observar que à medida que a doença avança, a ecologia dentro do sistema de canais radiculares se transforma, podendo essas alterações estarem relacionadas à exposição ao oxigênio quando os canais radiculares são abertos durante o tratamento, ao uso de agentes de irrigação do canal radicular e às variações no pH do canal devido a diferentes materiais introduzidos. Isso resulta em mudanças fenotípicas impulsionadas por modificações genéticas na população (Provenzano *et al.*, 2013).

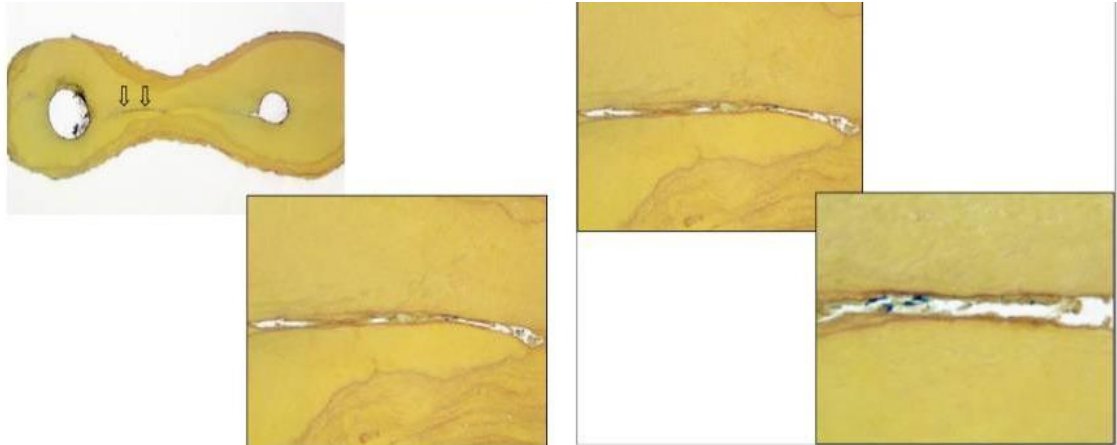
As infecções endodônticas podem ser classificadas como primárias ou secundárias. Em geral, a infecção primária envolve a inflamação da polpa e a infecção do canal radicular após a invasão por microrganismos ou seus subprodutos, eventualmente resultando na inflamação dos tecidos de suporte, enquanto a infecção secundária (ou infecção pós-tratamento) ocorre como reinfecção (adquirida ou emergente), infecção remanescente (persistente) ou infecção recorrente (reaparecimento em dentes após aparente cicatrização) em dentes previamente submetidos a tratamento endodôntico (Lacerda *et al.*, 2016).

As infecções endodônticas são polimicrobianas, sendo alguns dos principais microrganismos encontrados em dentes com tratamento endodôntico prévio com insucesso constatado o *E. faecalis*, espécies enterocócicas, espécies de streptocócicas e, correlacionado a fungos, *Candida albicans* (Provenzano *et al.*, 2013; Neelakantan *et al.*, 2017).

Acredita-se que a persistência de microrganismos dentro do sistema de canais radiculares após o tratamento é a principal causa de falha do tratamento (Prada *et al.*, 2019). As proporções dos microrganismos em infecções primárias podem ser diferentes após o tratamento do canal radicular, bem como uma mudança na propagação e quantidade de espécies. A microbiota encontrada em infecções secundárias, normalmente, é capaz de sobreviver a condições adversas, como uma ampla faixa de pH e condições limitadas de nutrientes, sendo possível analisar um contraste definido nos fenótipos microbianos em infecções primárias em comparação com infecções secundárias, sendo esta última predominante por bactérias gram-positivas (Neelakantan *et al.*, 2017).

Estudos têm mostrado a prevalência de algumas espécies em dentes com infecção pós-tratamento, como *Enterococos*, *Streptococos*, *Lactobacilos*, *Actinomyces* e fungos (como *Candida*). Em particular, uma alta proporção de *Enterococcus faecalis* em casos com periodontite apical persistente foi observada (Hu *et al.*, 2022).

**Figura 8: Cortes histológicos evidenciando microrganismos residuais após preparo químico-mecânico**



Fonte: Neelakantan *et al.*, 2017.

Legenda: Corte histológico da área do istmo entre dois canais em um molar inferior mostrando a presença de numerosas massas bacterianas com tecido. Revela a presença de bactérias residuais e detritos nas comunicações entre canais após limpeza e instrumentação dos sistemas de canais radiculares

Infecções mistas são mais comuns do que isolados de um único organismo. Além disso, a grande variedade de organismos encontrados nos canais radiculares pode ser parcialmente relacionada aos principais interesses e técnicas de cultura de diferentes investigadores. Os isolados da polpa exposta são semelhantes à microbiota oral na qual predominam os cocos gram-positivos, e aproximadamente 25% dos isolados são anaeróbios. Organismos associados a surtos (que são condições de emergência caracterizadas por dor e/ou inchaço) parecem compartilhar uma composição semelhante àquelas de canais radiculares assintomáticos. Essas são geralmente mudanças fenotípicas devido a mudanças ecológicas. Organismos cultivados de canais infectados elaboram uma variedade de enzimas invasivas, mas não está claro se isso pode ser equiparado à patogenicidade (Guo *et al.*, 2014).

O uso prolongado de drogas, especialmente antibióticos, leva ao desenvolvimento de resistência entre os microrganismos devido à expressão gênica alterada e à transferência de genes de resistência, tornando o agente antimicrobiano ineficaz (Barbosa-Ribeiro *et al.*, 2016; Segura-Egea *et al.*, 2017). Em acréscimo, a

presença da matriz substâncias poliméricas extracelulares (EPS) nas células bacterianas atua como uma barreira, aprisionando enzimas extracelulares, como a  $\beta$ -lactamase, que inativa os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Hall *et al.*, 2017).

Outro mecanismo de tolerância antimicrobiana é a formação de nichos anaeróbios profundos no biofilme, onde o oxigênio é completamente esgotado pelas bactérias da superfície (Gerdes *et al.*, 2016), resultando em uma subpopulação conhecida como persistente, que exibe um estado fenotípico altamente resistente a vários agentes antimicrobianos (Kaldalu *et al.*, 2016).

A detecção de *quorum*, um sistema bacteriano de comunicação célula a célula, ocorre por meio de moléculas de sinalização química, como o peptídeo estimulante de competência (CSP) (Majumdar *et al.*, 2017). Esse mecanismo permite que as bactérias se comuniquem umas com as outras e coordenem a expressão gênica, fazendo com que, dessa forma, as bactérias monitorem o ambiente para detectar a presença de outras bactérias e possam alterar seu comportamento em escala populacional. Essa comunicação em grupo melhora a persistência bem-sucedida das mesmas (Mangwani *et al.*, 2016).

Esta detecção também desempenha uma função significativa na formação de biofilmes e na reação ao estresse ambiental (Lillicrap *et al.*, 2016). A habilidade de coexistência entre distintas cepas microbianas, como *E. faecalis*, *Streptococcus gordonii* e *Lactobacillus salivarius*, está associada a características específicas de cada micróbio (Chávez de Paz *et al.*, 2015). A resistência variada à escassez de nutrientes e a produção de proteases em ambientes de biofilme influenciam a capacidade de coexistência e a virulência das bactérias (Chávez de Paz *et al.*, 2015). Além disso, genes específicos envolvidos na detecção de *quorum*, como o luxS, foram apontados como contribuintes para a capacidade de formação de biofilme por *E. faecalis* (He *et al.*, 2016).

Apesar desses avanços, a detecção de *quorum* e sua inibição no contexto dos canais radiculares ainda são pouco exploradas. Portanto, futuras pesquisas devem se concentrar no uso de inibidores de detecção de *quorum* como estratégias antibiofilme para esses canais.

### 2.4.1 *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* é parte da microbiota normal do trato gastrointestinal humano, especialmente no intestino grosso, todavia, apesar de ser comum nesse órgão, este microrganismo pode causar infecções em vários locais, como o trato urinário, regiões intra-abdominais, endocardite e em dispositivos médicos, como cateteres intravenosos e urinários (Ceci *et al.*, 2015; Tien *et al.*, 2017).

*E. faecalis* é um coco Gram-positivo, podendo crescer em meios comuns, formando colônias circulares, brilhantes e opacas, com crescimento em uma ampla faixa de temperatura (15-45°C) e pH (4,5-9,6). Como organismo facultativo anaeróbio, pode crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, realizando fermentação de carboidratos para produzir ácido lático, um dos principais metabólitos desse processo (García-Solache *et al.*, 2019).

Na endodontia, a erradicação de *E. faecalis* é crucial devido a seus vários fatores de virulência, incluindo aderência às células epiteliais, formação de biofilmes, produção de substâncias tóxicas como citolisina e gelatinase, e resistência a múltiplos antibióticos (Sakko *et al.*, 2016; Kart *et al.*, 2019). A formação de biofilmes é especialmente relevante, conferindo proteção contra o sistema imunológico e dificultando a ação de agentes antimicrobianos (Van Tyne *et al.*, 2013; Neelakantan *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2017).

A capacidade de aderir e colonizar superfícies, como tecidos epiteliais e dispositivos médicos, é mediada por proteínas de ancoragem na superfície bacteriana, como fímbrias e proteínas de adesão à matriz extracelular, permitindo a formação de biofilmes. Além disso, o microrganismo produz citolisina e gelatinase, danificando células hospedeiras e degradando a matriz extracelular. *E. faecalis* também secreta substâncias que interferem na resposta imune do hospedeiro, evitando a ação dos fagócitos e suprimindo a resposta inflamatória (Kao *et al.*, 2019).

Relevante é a capacidade de *E. faecalis* de adquirir e transferir genes de resistência a antibióticos e outros fatores de virulência para outras bactérias, contribuindo para a disseminação da resistência e o surgimento de cepas mais virulentas (Schroeder *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2017).

Na endodontia, a erradicação de *E. faecalis* é desafiadora, envolvendo agentes irrigantes antimicrobianos, como NaOCl e CHX, medicações intracanais com pastas de HC, e medidas rigorosas de biossegurança para prevenir a contaminação cruzada durante os procedimentos (Prada *et al.*, 2019).

### 2.4.2 *Streptococcus oralis*

*Streptococcus oralis*, uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa, desempenha um papel central na complexa ecologia da microbiota oral humana. Sua versatilidade biológica permite não apenas a sobrevivência em ambientes dinâmicos da cavidade oral, mas também exibe habilidades adaptativas que influenciam sua dinâmica populacional e interações com outros microrganismos (Choo *et al.*, 2021). A diversidade genética, como nos subgrupos *S. oralis mitis* e *S. oralis* subsp. *dentisani*, contribui para uma heterogeneidade funcional que enriquece a comunidade microbiana oral (Jansen *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2023), conferindo a *S. oralis* versatilidade evolutiva e plasticidade fenotípica cruciais para sua sobrevivência.

No aspecto metabólico, o destaque deste microrganismo está em sua notável capacidade de utilizar diversos substratos, adaptando-se às condições heterogêneas da cavidade oral (Kim *et al.*, 2022). Além de metabolizar carboidratos, estudos recentes aprofundaram a compreensão de suas vias metabólicas, evidenciando sua flexibilidade diante das condições variáveis (Choo *et al.*, 2021; Okahashi *et al.*, 2022). Sua habilidade de usar uma variedade de fontes de carbono, incluindo produtos do metabolismo de outros microrganismos, contribui para sua competitividade ecológica e exploração de nichos na boca.

As interações complexas de *S. oralis* com outros microrganismos vão além da competição por recursos, incluindo influência na expressão gênica e comportamento metabólico de microrganismos vizinhos (De Grandi *et al.*, 2019). Sua capacidade de aderir e coagregar com outras espécies bacterianas contribui para a formação de biofilmes dentários, crucial na colonização de novos sítios dentários e resistência a agentes antimicrobianos. Esta bactéria não é apenas um consumidor de recursos, mas um modulador ativo da ecologia microbiana oral, desempenhando um papel vital na homeostase bucal (Cavalcanti *et al.*, 2016).

Fatores de virulência, como adesinas, toxinas e enzimas, contribuem para a formação de biofilmes, influenciando sua virulência em ambientes orais distintos e implicando em implicações clínicas, desde infecções orais até endocardite. A transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos, impulsionada pela plasticidade genômica, é uma preocupação significativa, sendo elementos genéticos móveis cruciais nesse processo. Frente aos desafios da resistência a antibióticos, estratégias terapêuticas emergentes, como bacteriófagos, são exploradas para

combater cepas resistentes de *S. oralis*, oferecendo abordagens altamente direcionadas (Van Der Ploeg *et al.*, 2010; Giovanetti *et al.*, 2015).

No contexto da homeostase oral, *S. oralis* desempenha um papel multifacetado, contribuindo para a formação de biofilmes dentários, modulação do pH local e regulação do equilíbrio ácido-base. Sua produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico, influencia a dinâmica da comunidade microbiana oral, promovendo um ambiente favorável para microrganismos benéficos e inibindo patógenos. A capacidade de metabolizar lactato é essencial para manter o pH salivar ideal, prevenindo desmineralização e cárie dentária, além de contribuir para a remineralização e promoção da saúde bucal a longo prazo (Ferrer *et al.*, 2021).

No que tange à endodontia, este microrganismo participa ativamente na formação de biofilmes intracanais, contribuindo para a persistência e agravamento de infecções endodônticas em condições de necrose pulpar (Pandey *et al.*, 2016; Zandi *et al.*, 2018). Estudos previamente realizados disponíveis reconhecem espécies de *Streptococcus* e o grupo *mitis* como consideravelmente prevalentes em infecções endodônticas, bem como sua colaboração fenotípica para o estabelecimento do biofilme intracanal, utilizando-as para realização de análises de potencial antimicrobiano (Tawakoli *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2021; Retsas *et al.*, 2022)

#### **2.4.3 *Enterococcus faecium***

O *Enterococcus faecium*, um componente da microbiota gastrointestinal, destaca-se pela resistência a condições desfavoráveis. Pertencente ao gênero dos *Enterococcus*, esse microrganismo possui uma parede celular rica em peptideoglicano, conferindo-lhe a classificação de Gram positiva, que atua como um escudo protetor contra desafios ambientais (Gök *et al.*, 2020; Krawczyk *et al.*, 2021).

A capacidade de colonização deste microrganismo envolve expressão de fimbrias e produção de substâncias bioativas, como as enterocinas, que apresentam efeito antimicrobiano (Krawczyk *et al.*, 2021). Sua resistência antimicrobiana envolve códigos genéticos complexos, incluindo mecanismos de transferência horizontal de plasmídeos associados ao aumento da expressão de bomba de efluxo (Krawczyk *et al.*, 2021; Guzman Prieto *et al.*, 2016).

Seus fatores de virulência são complexos, com adesinas desempenhando um papel crucial na colonização persistente e formação de biofilmes (Gök *et al.*, 2020). A produção de enterocinas oferece uma resposta aos desafios ambientais, conferindo

ao microrganismo uma vantagem competitiva (Krawczyk *et al.*, 2021), todavia, enzimas como hialuronidase, substância de agregação e gelatinase, junto com propriedades de adesão a colágeno, contribuem para suas propriedades de sobrevivência (Enayati *et al.*, 2015).

Quanto à resistência à dessecação, o *E. faecium* desenvolve estratégias moleculares, como a produção de substâncias que retêm água intracelular e detecção de *quorum-sensing* (Salazar *et al.*, 2021), além de apresentar alta tolerância à salinidade, o que sugere a existência mecanismos eficazes de transporte iônico e regulação osmótica (Papadopoulou *et al.*, 2023). Sua capacidade de prosperar em ampla faixa de pH revela adaptações metabólicas complexas (Ghattargi *et al.*, 2018). Sua resistência intrínseca a antibióticos inclui bombas de efluxo e modificação dos sítios de ligação alvo (Guzman Prieto *et al.*, 2016; Premetis *et al.*, 2023).

Considerado um comensal inofensivo, *E. faecium* pode emergir como patógeno oportunista, especialmente em ambientes hospitalares (Arshadi *et al.*, 2018). Em ambientes anaeróbicos de canais radiculares, *E. faecium* demonstra alta adaptabilidade, virulência, alterações genótípicas e fenotípicas destacando sua relevância clínica em infecções endodônticas resistentes (Sedgley *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2019). Sua capacidade de metabolizar substratos contribui para a complexa teia trófica desses ambientes, influenciando dinamicamente a composição da microbiota endodôntica. Em condições de necrose pulpar, *E. faecium* encontra oportunidades de colonização favoráveis, desafiando a eficácia dos procedimentos terapêuticos convencionais (Prada *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2022).

#### **2.4.4 *Candida albicans***

A *Candida albicans*, um fungo pleomórfico patogênico em infecções fúngicas humanas, pertence à classe *Saccharomycetes*, apresentando características morfológicas distintas em meio de cultura ágar Sabouraud (Santana *et al.*, 2013). Com a capacidade de assumir formas de levedura ou hifa, essa espécie exibe uma plasticidade morfológica influenciada por condições ambientais como temperatura e pH (Arkowitz *et al.*, 2019). A transição entre formas leveduriformes e filamentosas é preponderante para sua virulência, permitindo a invasão de tecidos hospedeiros, formação de estruturas como pseudohifas, blastoconídios, e colonização eficaz (Mayer *et al.*, 2013).

Do ponto de vista genômico, este fungo possui um genoma haploide extenso, com diversidade genética entre cepas influenciando sua virulência e resposta a tratamentos antifúngicos (Mba *et al.*, 2022). Sua interação com células hospedeiras durante infecções envolve adesinas e um sistema de sinalização complexo, incluindo *quorum-sensing* (Witchley *et al.*, 2019). No metabolismo, a espécie é heterotrófica e fermenta glicose para produzir energia, gerando metabólitos como ácido lático e etanol (Lok *et al.*, 2020).

A resistência a antifúngicos é desafiadora e multifacetada, envolvendo mecanismos como a alteração da expressão de genes-alvo, redução da entrada dos antifúngicos e aumento de bombas de efluxo (Niimi *et al.*, 2022), enquanto fatores de virulência, como a produção de enzimas extracelulares, contribuem para danos teciduais e invasão, enquanto a formação de biofilmes protege contra o sistema imunológico e dificulta a ação dos antifúngicos (Lim *et al.*, 2021).

Na resposta imune, a interação com receptores de padrões moleculares associados a patógenos desencadeia respostas inflamatórias, mas *Candida albicans* também possui mecanismos de evasão imunológica (Bojang *et al.*, 2021). Em contextos endodônticos, considerada o fungo de maior prevalência associado a infecções primárias e secundárias com microbiota complexa, sua presença em canais radiculares, associada à formação de biofilmes resistentes e refratários, pode complicar o tratamento e contribuir para a progressão da doença (Kumar *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2020).

Estratégias terapêuticas em infecções endodônticas devem considerar a combinação de antifúngicos específicos, como MIC e irrigantes endodônticos eficazes, junto com procedimentos convencionais de desinfecção e obturação dos canais radiculares (Ahangari *et al.*, 2017; Zancan *et al.*, 2018).

## 2.5 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO NO ÂMBITO DA ENDODONTIA

O HC é amplamente empregado na prática endodôntica devido à sua ação multifacetada. Para além de suas propriedades antimicrobianas, essa substância apresenta características significativas que contribuem para a eficácia do tratamento endodôntico. Quando utilizado durante as sessões de endodontia, sua alta alcalinidade (pH 12,8) estabelece um ambiente hostil para a sobrevivência de microrganismos patogênicos, pois seu elevado pH atua como inibidor do crescimento e da proliferação de bactérias, fungos e outros microrganismos presentes no sistema

de canais radiculares (Lopes & Siqueira, 2015; Momenijavid *et al.*, 2022). A disseminação de íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) nas ramificações dos túbulos dentinários e sua permanência por um período adequado de contato direto são requisitos indispensáveis para promover uma destruição eficaz dos microrganismos envolvidos (Estrela, 2023).

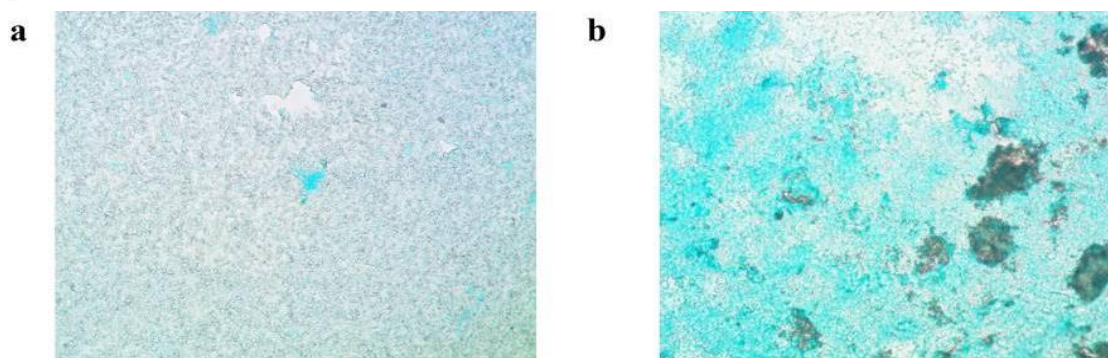
Esta ação antimicrobiana é particularmente benéfica na redução da carga bacteriana em áreas onde a substância consiga entrar em contato com a superfície, como canais principais, ramificações e canais acessórios (caso haja penetrabilidade), que são locais propícios para a persistência de infecções endodônticas. No processo de dissociação, o HC libera íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e íons  $\text{OH}^-$ , desempenhando um papel crucial sobre os tecidos e microrganismos (Lopes, Siqueira, 2015; Momenijavid *et al.*, 2022).

Além disso, esta substância atua como um agente alcalinizante, neutralizando a acidez do biofilme e dos subprodutos metabólicos produzidos pelas bactérias, contribuindo para a desorganização e remoção do biofilme bacteriano aderido às paredes do canal radicular e auxiliando na desinfecção do sistema de canais radiculares (Momenijavid *et al.*, 2022).

Outro benefício do HC na endodontia é sua capacidade de estimular a formação de dentina reparadora através do estímulo aos odontoblastos adjacentes (células responsáveis pela produção de dentina), estímulo este que resulta na deposição de uma camada de dentina reparadora nas áreas afetadas, auxiliando na selagem do sistema de canais radiculares por capeamento indireto. (Alfadda *et al.*, 2021).

Dessa forma, o HC demonstra eficácia contra as bactérias localizadas nos túbulos dentinários, uma vez que os íons  $\text{OH}^-$  têm a habilidade de se difundir através da dentina e atingir concentrações iônicas suficientemente elevadas para exercer um efeito letal sobre os microrganismos. Entretanto, é importante enfatizar que o HC demanda cerca de uma semana após deposição para efetivamente realizar sua atividade antimicrobiana no interior dos túbulos dentinários, demanda concentração elevada para promover efeito bacteriostático sobre grande parte dos microrganismos resistentes, bem como tem demonstrado ter capacidade limitada para modular determinados biofilmes bacterianos (Lopes & Siqueira, 2015; Barbosa-Ribeiro *et al.*, 2018; Cosan *et al.*, 2022).

**Figura 9: Microscopia óptica de polissacarídeo de biofilme tratado com HC antes e após 21 dias**



Fonte: adaptado de Momenijavid *et al.*, 2022.

Legenda: Imagens de microscopia óptica de polissacarídeos de biofilme de *E. faecalis* corados com 21 dias após 7 dias de contato com soluções. (a), Controle, sem solução; (b), HC. Concluiu-se que a concentração de polissacarídeos no grupo HC foi significativamente diferente dos demais grupos.

Um aspecto de suma importância para a ação antimicrobiana desta substância reside na escolha criteriosa do veículo empregado em conjunto com a medicação. Estudos têm comprovado que o tipo de veículo associado à substância exerce uma influência direta sobre a concentração e a taxa de liberação dos íons  $\text{OH}^-$ , o que, por consequência, impacta significativamente na eficácia antimicrobiana da pasta utilizada. Em relação ao tipo de veículo, podemos classificar em: veículos inertes e biologicamente ativos (Kim *et al.*, 2014).

Os veículos inertes se destacam por sua característica de serem, em sua maioria, biocompatíveis, sem, contudo, exercerem qualquer influência nas propriedades antimicrobianas do HC. Exemplificando essa categoria, encontramos substâncias como soro fisiológico, água destilada, soluções anestésicas, glicerina, polietilenoglicol e propilenoglicol. Por outro lado, os veículos biologicamente ativos conferem à pasta efeitos adicionais aos já proporcionados pelo HC. Entre os exemplares dessa categoria, podemos mencionar o Paramonoclorofenol canforado (PMCC), a CHX e o iodeto de potássio. Essas substâncias adicionam propriedades específicas que complementam a ação antimicrobiana da pasta, resultando em benefícios adicionais no tratamento endodôntico (Arslan *et al.*, 2020; Rôças *et al.*, 2023).

Em um estudo de controle randomizado conduzido por Menakaya *et al.* (2015), a eficácia do HC, em conjunto com soro fisiológico (como veículo aquoso), foi comparada com o digluconato de CHX 0,2% no contexto do controle da dor pós-operatória. Para avaliar a intensidade da dor, foram utilizadas ferramentas universais

de avaliação da dor, registradas em intervalos de 1 dia, 1 semana e 1, 3 e 6 meses após o procedimento de obturação. A dor pós-operatória manifestou-se somente nos intervalos de 1 dia e 1 semana. Apesar da incidência de dor pós-operatória ter sido superior no grupo experimental em relação ao grupo controle, essa diferença não alcançou relevância estatística.

Apesar dos achados destacados acima, cabe ressaltar que, independentemente do veículo utilizado associado ao HC, o mesmo apresentou efeitos positivos na otimização do potencial antimicrobiano da terapia endodôntica, além de outros potenciais efeitos benéficos como o controle da dor. Cientificamente ainda não há um consenso acerca de qual veículo recomenda-se utilização, tendo em vista que as variáveis e metodologias utilizadas nos estudos relacionados são diferentes, bem como concentrações e efeitos positivos encontrados em suas variedades, sendo constatados diferentes resultados mediante a variável de interesse dos respectivos estudos (Kim *et al.*, 2014).

## 2.6 QUITOSANA E ENDODONTIA

A quitina, um polissacarídeo linear composto por unidades de N-acetil-D-glucosamina ligadas por  $\beta$ -(1,4), é considerada uma das substâncias naturais mais abundantemente produzidas e biodegradáveis. Existem três polímeros distintos da quitina em termos de estrutura:  $\alpha$ -quitina, que forma uma estrutura altamente compactada em células ortorrômicas com lâminas alternadas de células paralelas e cadeias antiparalelas;  $\beta$ -quitina, onde as cadeias polissacarídicas estão dispostas de forma paralela, com forças intermoleculares mais fracas do que na  $\alpha$ -quitina; e  $\gamma$ -quitina, que possui um arranjo de duas folhas paralelas e uma antiparalela. A maioria das quitinas naturais tende a possuir predominantemente uma destas estruturas (Hamed *et al.*, 2016).

A extração da quitina em escala industrial é realizada a partir de resíduos de conchas marinhas, comumente através de métodos químicos. O processo industrial típico envolve três etapas principais: desproteinização da matéria-prima utilizando uma solução alcalina, desmineralização por meio do tratamento com solução ácida e, finalmente, descoloração do produto obtido com uma solução alcalina (Leceta *et al.*, 2014; Philibert *et al.*, 2016; Muxika *et al.*, 2017). Apesar de suas notáveis características funcionais, como biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade e alta resistência mecânica, a quitina possui uma utilidade limitada devido à sua baixa

solubilidade, tornando a quitosana enfoque de estudos (Azuma *et al.*, 2015; Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016; Bedian *et al.*, 2017).

A conversão da quitina em quitosana pode ocorrer por processos enzimáticos ou químicos, sendo a conversão química preferível devido ao menor custo e à adequação para produção em massa (Muxika *et al.*, 2017; Yumoto *et al.*, 2018). A desacetilação química envolve o tratamento da quitina com hidróxidos em altas temperaturas, geralmente acima de 80°C (Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016). Em condições mais drásticas, como altas concentrações de NaOH (50-60%) e temperaturas elevadas (130-150°C), a desacetilação ocorre rapidamente, em cerca de 2 horas. No entanto, nessas condições mais severas, o peso molecular da quitosana diminui, sendo necessário encontrar um equilíbrio entre o processo de desacetilação e as propriedades finais da quitosana.

A quitosana é um copolímero aleatório obtido pela desacetilação alcalina da quitina, composto por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, unidas por ligações glicosídicas -1,4, sendo o grau de desacetilação que indica a proporção entre essas unidades (Bedian *et al.*, 2017; Muxika *et al.*, 2017; Verlee *et al.*, 2017). Quando o grau de desacetilação atinge cerca de 50%, a quitosana torna-se solúvel em meio aquoso ácido (Muxika *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 1997).

Em um ambiente ácido, a dissolução da quitosana resulta na protonação dos grupos amino em sua cadeia, tornando o polímero catiônico, permitindo que a mesma interaja com uma variedade de moléculas (Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016), tornando-a o único polissacarídeo marinho com carga positiva. Esta carga é acreditada como responsável por sua atividade antimicrobiana, pela interação com as membranas celulares carregadas negativamente dos microrganismos (Cazón *et al.*, 2017).

Além das aplicações biomédicas derivadas de suas propriedades antibacterianas e antioxidantes (El-Hack *et al.*, 2020), a quitosana também exibe propriedades de quelante seletivo para íons como ferro, cobre, cádmio ou magnésio, entre outros, abrindo portas para uma variedade de outras aplicações (Ahmed *et al.*, 2016; Ardial *et al.*, 2017; Muxika *et al.*, 2017).

Sua solubilidade oferece a oportunidade de ser processada em várias formas, como filmes, nanofibras, hidrogéis ou pastas, embora recentemente tenham sido estudados alguns usos na forma pulverulenta não dissolvida (Ahmed *et al.*, 2016; Ardial *et al.*, 2017; Muxika *et al.*, 2017).

A quitosana exibe considerável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Qin *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2014; Cheah *et al.*, 2019). A eficácia antimicrobiana da quitosana depende de vários fatores cruciais, incluindo o tipo de patógeno, o pH do meio, as propriedades estruturais (como o grau de desacetilação - DA e o peso molecular - MW), a fonte e a concentração de quitosana (Hosseinnejad *et al.*, 2016; Sahariah *et al.*, 2017; El-Hack *et al.*, 2020).

O pH do meio desempenha um papel significativo na atividade antimicrobiana da quitosana, com sua eficácia observada em pH abaixo de 6,5. Isso é atribuído à abundância de grupos amino no polímero, nos quais os grupos -NH positivamente carregados aumentam a ligação com os constituintes de membranas bacterianas carregadas negativamente, possivelmente contribuindo para sua ação antimicrobiana (Sahariah *et al.*, 2017; El-Hack *et al.*, 2020). É digno de nota ressaltar que seu mecanismo de ação ainda não é completamente elucidado (El-Hack *et al.*, 2020).

A quitosana se destaca pela presença de grupos terminais de hidroxila e amino, o que aumenta sua capacidade de interagir com várias espécies reativas durante as reações químicas (Negm *et al.*, 2020a; Negm *et al.*, 2020b). Esses grupos são essenciais para essa interação, e fatores como o grau de desacetilação e o peso molecular do polímero influenciam sua disponibilidade. Especificamente, a alta tendência da quitosana em doar átomos de hidrogênio contribui significativamente para sua atividade antioxidante (Negm *et al.*, 2020a).

No âmbito da endodontia, a quitosana tem sido explorada, bem como suas potenciais aplicabilidades, em especial no processo de revascularização, otimização do processo de desinfecção e da bioatividade do cimento obturador (Diogenes *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2016; Ratih *et al.*, 2022). A revascularização tem como principais objetivos promover o fechamento o ápice radicular, aumentar o comprimento da raiz, aumentar o volume das paredes do canal radicular e alcançar a regeneração pulpar. Inicialmente desenvolvida para tratar dentes necróticos imaturos, todavia, este procedimento também tem sido realizado em dentes permanentes necróticos, dentes permanentes maduros vitais e dentes reabsorvidos com histórico de trauma (Diogenes *et al.*, 2016).

Durante a revascularização, a estrutura mais comumente utilizada é o coágulo sanguíneo. No entanto, há uma variedade crescente de estruturas que têm se mostrado clinicamente bem-sucedidas. Estas incluem, dentre outros, hidrogéis de quitosana com e sem dentina microparticulada (Wu *et al.*, 2021).

Em um estudo conduzido por Shrestha *et al.* (2016), foi constatado que a quitosana propicia notável atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral baseado no mecanismo de interação eletrostática, inibição da transcrição e síntese de mRNA, que leva à ruptura da membrana celular, entretanto, os efeitos da ação antibacteriana do material são influenciados pela duração, concentração e tempo de contato. É importante destacar que essa atividade é inibida por fragmentos pulpare e albumina sérica bovina, enquanto não há efeitos observados da matriz dentária e lipopolissacarídeos (LPS).

Em outro trabalho conduzido por Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2014) em um ambiente *in vitro*, testes mostraram que a utilização de nanopartículas de quitosana juntamente com clorexidina foi capaz de eliminar com sucesso a bactéria *E. faecalis* dos canais radiculares. Um estudo comparativo realizado em laboratório focou na eficácia das nanopartículas de quitosana isoladas e das nanopartículas de quitosana carregadas com clorexidina contra *E. faecalis*. Os resultados indicaram que a combinação com clorexidina apresentou uma redução mais significativa no número de colônias bacterianas em placas de ágar, quando comparada às nanopartículas de quitosana isoladas.

Em outro estudo conduzido por Ratih *et al.* (2022) concluiu que a inclusão de nanopartículas de quitosana em concentrações de 10%, 20% e 30% no selante demonstrou uma eficácia antibacteriana aprimorada e uma menor toxicidade celular em comparação com a formulação sem quitosana.

Isto posto, constata-se que a quitosana tem sido objeto de ensaios recorrentes para avaliação de suas potenciais aplicabilidades seguras no âmbito da endodontia, sendo considerada uma substância promissora, ancorado nos resultados obtidos em estudos previamente conduzidos.

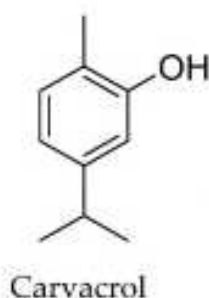
## 2.7 CARVACROL E ENDODONTIA

O 2-metil-5-[1-metiletil]-fenol, também conhecido como Carvacrol, substância volátil com odor característico (Oliveira *et al.*, 2021), é classificado como um álcool monoterpênico derivado do cimeno, contendo fórmula química  $C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$ , caracterizado por sua forma líquida com um ponto de ebulição situado em 236–238°C e uma densidade de 0,976 g/mL a 20°C e 0,975 g/mL a 25°C (Imran *et al.*, 2022; Mączka *et al.*, 2023). Apresenta insolubilidade em água, no entanto, revela alta solubilidade em etanol, acetona e éter dietílico (Mączka *et al.*, 2023).

Esta substância é identificada como um constituinte presente em óleos essenciais provenientes de diversas plantas como *Corido thymus*, *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), *Nigella sativa* (cominho preto), *Origanum compactum* (orégano), *O. dictamnus*, *O. microphyllum*, *O. onites*, *O. scabrum*, *O. vulgare*, *Lepidium flavum* (pimenta), *Citrus aurantium* var. *Bergamia Loisel* (bergamota selvagem), *Monarda didyma*, *Thymus glandulosus* (tomilho) e *Satureja hortensis* (segurelha de verão) (Mączka *et al.*, 2023).

Importante notar que a proporção de carvacrol pode variar dependendo do tecido. No caso de *Origanum vulgare* "Quente e Picante", o carvacrol se destaca como o principal componente encontrado nas pétalas ( $94,40 \pm 1,23\%$ ), tépalas ( $96,92 \pm 0,85\%$ ), brácteas ( $96,07 \pm 0,67\%$ ) e folhas ( $84,71 \pm 1,59\%$ ), enquanto o *p*-cimeno predomina nas hastes ( $65,44 \pm 5,77\%$ ), com uma presença relativamente menor de carvacrol ( $13,06 \pm 6,74\%$ ) (Marinelli *et al.*, 2018; Mączka *et al.*, 2023).

**Figura 10: Estrutura química do carvacrol**



Fonte: adaptado de Mączka *et al.*, (2023).  
 Legenda: estrutura química do Carvacrol

O carvacrol é biossintetizado nas plantas a partir do  $\gamma$ -terpineno, formado pela via do mevalonato ou pela via do metileritritol que ocorre em plastídios (MEP) (Friedman *et al.*, 2014; Mączka *et al.*, 2023). Uma pesquisa conduzida por Krause *et al.* (2021) propôs uma via específica de biossíntese do carvacrol em plantas da família *Lamiaceae*. Nessa rota, o  $\gamma$ -terpineno é oxidado pelas monooxigenases do citocromo P450 (CYP) da subfamília CYP71D, gerando um intermediário ciclohexadienol instável, que passa por desidrogenação por uma desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR), resultando na cetona correspondente, que é convertida no carvacrol final (Krause *et al.*, 2021).

Testes *in vitro* e *in vivo* em *Nicotiana benthamiana* mostraram que a presença conjunta dessas enzimas produz carvacrol, enquanto na ausência de SDR, apenas *p*-

cimeno é formado. Os genes da via biossintética do carvacrol coexpressam-se com fatores de transcrição, como ZIP e bHLH, indicando sua regulação (Tohidi *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022; Mączka *et al.*, 2023).

Na síntese orgânica, o carvacrol é obtido por alquilação de Friedel-Crafts do o-cresol com propileno ou álcool isopropílico, utilizando catalisadores de ácido sólido, como UDCaT-5, alumínio ou cloreto de ferro (III). Alternativamente, pode ser produzido por sulfonação do *p*-cimeno seguida de fusão alcalina, cloração do  $\alpha$ -pineno com hipoclorito de terc-butila, ou através da aromatização da carvona (Mączka *et al.*, 2023).

Devido ao seu odor (cheiro de orégano) e propriedades antimicrobianas, o carvacrol é comumente utilizado na indústria alimentícia como conservante natural de alimentos, sendo aprovado pelo FDA de acordo com o Conselho da Europa. O mesmo é considerado um agente aromatizante químico de Categoria B, sendo listado como tal para uso em alimentos. As recomendações estabelecem que ele pode ser adicionado a alimentos em níveis específicos, como 2 ppm em bebidas, 5 ppm em flocos e 25 ppm em doces (Salehi *et al.*, 2018).

Na prática odontológica, carvacrol tem sido empregado como substituto do cretol e do ácido carbólico no tratamento de dor de dente, dentina sensível e abscesso alveolar, além de ser utilizado como antisséptico nos canais pulpares dos dentes. Adicionalmente, destaca-se por sua eficácia no combate aos mosquitos, apresentando atividade repelente significativamente maior do que a preparação comercial N, N-dietil-m-metilbenzamida. O carvacrol também demonstra redução na eclodibilidade dos ovos e indução de infertilidade nos mosquitos (Mączka *et al.*, 2023).

Além das notáveis propriedades antimicrobianas, esta substância exibe uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como cardioproteção, renoproteção e neuroproteção (Azizi *et al.*, 2022), modulação da resposta imune (Pelvan *et al.*, 2022), ação antioxidante, antiinflamatória (Chen *et al.*, 2017; Ezz-eldin *et al.*, 2020), atividade antitumoral (Sampaio *et al.*, 2021; Ezz-eldin *et al.*, 2020), propriedades analgésicas (Ezz-eldin *et al.*, 2020), dentre outros.

Seu mecanismo de ação antioxidante, justifica-se pela presença do grupo OH<sup>-</sup>, sendo a principal responsável por sua capacidade de eliminar radicais, incluindo radicais superóxido, NO e peróxido de hidrogênio. Sua natureza de ácido fraco facilita a doação de átomos de hidrogênio para elétrons desemparelhados, resultando na

estabilização de outro radical por meio da dispersão de elétrons na estrutura de ressonância da molécula (Cocolas *et al.*, 2019; Imran *et al.*, 2022).

Carvacrol exhibe propriedades anti-inflamatórias e protege contra doenças digestivas e orais, atuando como agonista do receptor TRPA1 (canal catiônico de potencial receptor transitório, subfamília A, membro 1). Em um estudo conduzido em 2016 por Alvarenga e colaboradores, foi revelado que o carvacrol possui propriedades anti-inflamatórias que ajudam a mitigar doenças orais intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) a 75 mg/kg, administrado por via intraperitoneal durante 4 dias, por meio da ativação do TRPA1. Carvacrol ativou o TRPA1, resultando na redução de indicadores inflamatórios como os receptores mieloperoxidase (MPO), fator nuclear kappa B (NF-kB) e ciclooxigenase 2 (COX-2). Além disso, houve uma diminuição na liberação ou produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 e KC, assim como a redução de eROS, como GSH, MDA e níveis de NOx. Observou-se também que o carvacrol melhorou a contagem bacteriana no sangue, o leucograma, a variabilidade da massa corporal e a taxa de sobrevivência. Ao mesmo tempo, restaurou a estrutura das vilosidades no intestino delgado (Lima *et al.*, 2013; Alvarenga *et al.*, 2016; Imran *et al.*, 2022).

Na pesquisa conduzida por Jafri *et al.* (2020), foi constatado que as células de *Candida albicans*, quando tratadas com carvacrol, apresentaram superfícies irregulares, múltiplas lesões de hifas, redução no número de células, inibição da formação de biofilme em até 80%, e supressão da síntese de ergosterol. Miranda *et al.* (2021), por sua vez, examinou a atividade do carvacrol em *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis*, confirmando sua propriedade antifúngica com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 161,3 mg/L.

Ismail *et al.* (2022) conduziram pesquisas sobre o efeito do carvacrol na cepa patogênica *Candida auris*. Os resultados indicaram que o carvacrol inibiu o crescimento de todos os isolados de *C. auris*, com uma CIM variando de 125 a 500  $\mu$ g/mL, e os valores da Concentração Mínima de Fungicida (MFC) estavam na faixa de 250 a 1000  $\mu$ g/mL. As enzimas antioxidantes de *C. auris*, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione transferase (GST), foram analisadas após exposição ao carvacrol. Foi observado um aumento na atividade de CAT, SOD e GPx com concentrações crescentes de carvacrol, enquanto houve uma diminuição na atividade de GR e GST. Os pesquisadores confirmaram a capacidade do carvacrol de reduzir a expressão de

genes que codificam enzimas antioxidantes e também verificaram seu efeito na hemólise, que variou de 0,9% a 26,8%.

A eficácia antifúngica do carvacrol foi avaliada em combinação com antibióticos como fluconazol, cetoconazol ou anfotericina B contra oito cepas de *Candida*, incluindo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*. A CIM para o carvacrol isolado variou de 128 a 512 µg/mL. Observaram-se diferentes interações entre o carvacrol e os antifúngicos: sinergismo em 25% das combinações, aditividade em 25% e inércia em 50%. Não foram observados efeitos antagonistas. Efeitos sinérgicos foram notados, especialmente com as combinações carvacrol/cetoconazol e anfotericina B contra *C. guilliermondii* LM-103, e fluconazol contra *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Nóbrega *et al.*, 2019).

Em pesquisas sobre o modo de ação do carvacrol contra *Aspergillus flavus*, foi observado que a produção de ergosterol (5,7-dieno oxisterol) no micélio diminui à medida que a concentração de carvacrol aumenta, sugerindo que este seja o mecanismo de ação antifúngico, isto é, dano a membrana celular (Qu *et al.*, 2021).

Em estudos conduzidos por Wijesundar *et al.*, foi constatado que o carvacrol provocou deformações e danos nas células bacterianas, resultando na desativação de EPS, os quais têm a responsabilidade de proteger a célula contra substâncias tóxicas e garantir sua resistência. Além disso, o carvacrol reduziu as propriedades hidrofóbicas das estruturas bacterianas multicelulares em até 84,2% e foi capaz de diminuir a expressão do gene *luxS* associado à formação de biofilmes por *Streptococcus pyogenes*.

Já Mechmechani *et al.* (2022) investigaram o impacto das microcápsulas de carvacrol na capacidade de formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. O carvacrol reduziu o biofilme de *P. aeruginosa* abaixo do limite de detecção em apenas 15 minutos. Uma CIM quatro vezes menor (1,25 mg/mL) foi observada para *P. aeruginosa* (CIM = 5 mg/mL) quando microcápsulas foram utilizadas. No entanto, em relação a *E. faecalis*, os resultados foram comparáveis tanto para o carvacrol livre quanto para as microcápsulas (CIM = 0,625 mg/mL). O carvacrol causou desestabilização na membrana celular bacteriana, levando à morte celular.

A atividade antibacteriana do carvacrol, mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas em comparação com as Gram-negativas, é principalmente baseada em danos causados à membrana bacteriana. Esse efeito resulta na dissolução da

força motriz do próton, levando a uma redução subsequente na síntese de ATP, o que, por sua vez, resulta na diminuição de outros processos celulares dependentes de energia, incluindo a síntese de enzimas e toxinas (Magi; Marini; Facinelli, 2015).

Em particular, o carvacrol tem sido amplamente avaliado como um agente antimicrobiano em alimentos para o controle de patógenos, abrangendo tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Estes incluem *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *V. vulnificus* (Langeveld *et al.*, 2014; Magi *et al.*, 2015).

No âmbito da Endodontia, poucos estudos foram conduzidos correlacionando a potencial aplicabilidade do carvacrol. Um deles, conduzido por Meneses *et al.* (2020), utilizou cateteres uretrais de 1,5mm para simular o espaço do canal radicular, sendo cada extremidade selada com cianoacrilato gel éster para evitar transbordamento. Feito isto, a pasta de carvacrol foi preparada com os seguintes componentes e proporções: 0,26 g de carvacrol, 2 g de beta-ciclodextrina e 2 ml de água destilada, depois colocada no interior dos tubos.

A aplicação da pasta de carvacrol, tanto de forma isolada quanto em combinação com a fotobiomodulação a laser (LPBM), induz eventos biológicos que beneficiam a reparação tecidual de lesões subcutâneas no dorso de ratos. É importante destacar que os grupos submetidos à combinação das duas terapias (CVCLT) apresentaram os resultados mais eficazes, acelerando o processo de reparo da área ferida. Isso foi evidenciado pela redução nas fases inflamatória e fibroblástica de maturação, indicando uma melhoria significativa no processo de reparação tecidual.

Outro estudo, conduzido por Cosan *et al.* (2022), utilizou óleos essenciais de *Origanum dubium* (*O. dubium*) e *Mentha spicata* (*M. spicata*) associados na proporção 1:1 com HC para determinar bioatividade, tendo as análises de GC e GC-MS revelado que *O. dubium* e *M. spicata* apresentaram composições majoritárias de carvacrol (75,8%) e carvona (71,3%). O óleo essencial de *M. spicata* mostrou ser um agente antimicrobiano eficaz contra *C. albicans*, enquanto o óleo de *O. dubium* demonstrou grande eficácia contra *E. faecalis* e *C. albicans*. Esses resultados indicam que esses óleos essenciais naturais têm potencial para serem considerados como candidatos promissores em medicamentos intracanaais alternativos para futuras aplicações clínicas de rotina.

Mais pesquisas devem ser realizadas a fim de avaliar o potencial uso do carvacrol líquido ou em forma de gel como MIC para sessões de tratamento endodôntico com intervalo igual ou inferior a 3 dias, bem como seu potencial sinergismo com o HC em associação para intervalo entre sessões superiores a 4 dias, podendo talvez mostrar-se uma eficaz associação que predisponha um efeito em um tempo menor ao demandando pelo HC, bem como a manutenção da bioatividade tardia predisposta pelo aumento do pH gerado por esse composto em intervalos maiores.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico, antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano de carvacrol, bem como avaliar ação antimicrobiana e estabilidade de diferentes formulações contendo quitosana e carvacrol com a potencial aplicabilidade no tratamento endodôntico.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do carvacrol diferentes concentrações;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do carvacrol;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* do carvacrol diante de microrganismos relacionados a infecções endodônticas persistentes, pressupondo mecanismo de ação;
- Avaliar a atividade antibiofilme de população nas etapas de proliferação e adesão *in vitro*, utilizando carvacrol;
- Desenvolver formulações contendo quitosana e carvacrol;
- Avaliar a estabilidade preliminar das formulações;
- Caracterização físico-química da formulação.
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* das formulações

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS DE ESTUDO

Carvacrol utilizado neste estudo foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, EUA), apresentando 98% de pureza. A quitosana foi obtida do mesmo laboratório, contendo 85% de grau de desacetilação.

### 4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CARVACROL *IN VITRO*

#### 4.2.1 Análise da citotoxicidade do carvacrol em macrófagos peritoneais e fibroblastos

A avaliação da citotoxicidade foi conduzida por meio do ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Os fibroblastos da linhagem L929 foram transferidos para placas de cultura de 96 poços, com uma densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço, assim como os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, que foram adicionados com uma densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço. Ambos os tipos celulares foram tratados com carvacrol, utilizando concentrações que variaram de 18,75 a 300,00 µg/mL, dobrando a concentração a partir da menor concentração até a maior. Como controle, células tratadas apenas com dimetilsulfóxido (DMSO) foram empregadas. As células foram incubadas por um período de 48 horas em uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono a uma temperatura de 37 °C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e uma solução de MTT a 5 mg/mL, composta por 10 µL, foi adicionada a 90 µL de meio suplementado. As placas foram então incubadas por um período de 2 horas e 30 minutos a uma temperatura de 37 °C, em uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono. O experimento foi realizado em duplicata e em três repetições para cada concentração testada. A absorbância (Abs) foi medida a 570 nm utilizando um espectrofotômetro, e a viabilidade celular (%) foi calculada com base na seguinte fórmula.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (controle negativo)}} \times 100$$

Onde, Abs (amostra) representa a absorbância medida após o tratamento das células com a amostra em questão, e Abs (controle) refere-se à absorbância medida após o tratamento das células com DMSO, que é o veículo utilizado.

## **4.2.2 Avaliação da atividade antioxidante do carvacrol**

### **4.2.2.1 Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (eROS)**

Os níveis intracelulares de eROS em macrófagos peritoneais estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) foram avaliados utilizando o 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Stroppa *et al.*, 2017). As células foram incubadas por um período de 48 horas na presença de diferentes concentrações de carvacrol, variando de 18,75 a 300,00  $\mu$ g/mL, sendo estimuladas simultaneamente com LPS a uma concentração de 1  $\mu$ g/mL e IFN- $\gamma$  a 1 ng/mL. Um grupo de macrófagos foi estimulado, mas não recebeu tratamento, e serviu como controle.

Após o período de incubação, os macrófagos foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubados com H<sub>2</sub>DCFDA (1 mM) por 30 minutos, protegidos da luz, em uma atmosfera a 37°C contendo 5% de dióxido de carbono. Os níveis de eROS foram mensurados utilizando um espectrofluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm. O experimento foi repetido em duplicata e em três repetições para cada concentração testada, e os resultados foram expressos em termos de intensidade de fluorescência.

## **4.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do carvacrol**

### **4.2.3.1 Redução dos níveis de óxido nítrico (NO)**

A produção de NO foi avaliada de maneira indireta através da quantificação de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) utilizando o método de Griess, conforme descrito por Sun e colaboradores (2003). Os macrófagos peritoneais foram expostos às diferentes concentrações de carvacrol, variando de 18,75 a 300,00  $\mu$ g/mL, e foram simultaneamente estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu$ g/mL e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) na concentração de 1 ng/mL. Posteriormente, as células foram incubadas por um período de 48 horas em uma incubadora a 37°C sob uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono. Para fins de controle, foram utilizadas células não tratadas, células estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  (controle de estímulo) e células sem tratamento (controle basal).

Após o período de incubação, o sobrenadante das culturas foi transferido para uma placa de 96 poços, onde foi realizado o teste indireto para medir a concentração de NO. As absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade

de NO<sub>2</sub>- nas amostras foi determinada em µM por meio de uma curva padrão gerada a partir de uma solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), conforme descrito por Guevara *et al.*, (1998). O experimento foi repetido em duplicata e em três replicatas para cada concentração testada.

#### **4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do carvacrol**

Procedimentos realizados com linhagens fúngicas em meios de suspensão na sua forma livre.

##### **4.2.4.1 Linhagens bacterianas**

Para a condução do estudo antibacteriano *in vitro* foram empregadas as linhagens de: *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Enterococcus faecium* (ATCC 6569) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557). As bactérias foram gentilmente fornecidas pela Professora Doutora Ana Carolina Moraes Apolônio, vinculada ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

##### **4.2.4.2 Linhagem fúngica**

Para a realização do estudo antifúngico *in vitro* foi utilizada *C. albicans* (ATCC 10231), caracterizada por ser resistente à anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol (ATCC, 2017). Este microrganismo foi gentilmente cedido pelo Professor Marcelo Gonzaga Araújo da Universidade Federal de São João Del Rei, *campus* Dona Lindu (UFSJ).

##### **4.2.4.3 Preparação do inóculo bacteriano**

Todas as linhagens bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton sob condições de fluxo laminar. Posteriormente, as placas foram incubadas a uma temperatura de 36±1°C ao longo de 24 horas, com o propósito de monitorar o crescimento e a viabilidade das bactérias. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram transferidas para tubos de vidro que continham 5 mL de solução salina estéril a 0,85%, com o objetivo de atingir uma concentração alvo de 1,5x10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL), correspondente ao padrão 0,5 na escala de McFarland. Subsequentemente, foram realizadas diluições, nas quais 50 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo de vidro contendo 4,950 mL de solução salina, a fim de obter um inóculo com concentração de 1,5x10<sup>6</sup> UFC/mL. Por fim, o inóculo com concentração de 1,5x10<sup>6</sup> UFC/mL foi diluído

em microplacas de 96 poços (KASVI® K12-096), resultando em uma concentração final de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL em cada poço da microplaca.

#### 4.2.4.4 Preparação do inóculo fúngico

A linhagem fúngica foi inoculada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud sob condições de fluxo laminar e posteriormente incubada a uma temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas para permitir o crescimento e desenvolvimento dos fungos. Após a incubação, as colônias fúngicas foram transferidas para tubos de vidro contendo 5 mL de água estéril, visando alcançar uma concentração alvo de  $3 \times 10^6$  UFC/mL, correspondente ao padrão 1 na escala de McFarland. Em seguida, procedeu-se as diluições, nas quais 50  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica foram transferidos para um tubo de vidro contendo 4,950 mL de água estéril, a fim de obter um inóculo com uma concentração de  $3 \times 10^4$  UFC/mL. Por fim, o inóculo com uma concentração de  $3 \times 10^4$  UFC/mL foi diluído em microplacas de 96 poços (KASVI® K12-096), resultando em uma concentração final de  $3 \times 10^3$  UFC/mL em cada poço da microplaca.

#### 4.2.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio para determinar a atividade antibacteriana e antifúngica foi conduzido empregando o método de microdiluição seriada em microplacas estéreis de 96 poços (KASVI® K12-096), conforme as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) modificado (2017) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) modificado (2018). As substâncias foram inicialmente preparadas em uma concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  em água e, posteriormente, foram submetidos a diluições sucessivas para alcançar concentrações que variaram de 200 a 1,56  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, 160  $\mu\text{L}$  da solução estoque a 200  $\mu\text{g/mL}$  foram transferidos para as microplacas de 96 poços, que já continham 200  $\mu\text{L}$  na primeira linha e 180  $\mu\text{L}$  nas demais linhas, contendo caldo Mueller-Hinton (para bactérias) ou caldo RPMI (para fungos). Para completar o volume final de 200  $\mu\text{L}$  em cada poço, 20  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano ou fúngico com concentração de  $1,5 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) para bactérias e  $3 \times 10^6$ , respectivamente, de acordo com o padrão de turbidez da escala de McFarland (0,5 para bactérias e 1 para fungos), foram adicionados à amostra em cada poço. As placas contendo bactérias e fungos foram então incubadas em uma estufa a uma temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,

respectivamente, ao longo de 24 horas. Simultaneamente, foram realizados controles de crescimento das bactérias e dos fungos em placas separadas, contendo caldo Mueller Hinton (para bactérias) e RPMI (para fungos), assim como inóculo bacteriano e fúngico, que não continham o complexo, juntamente com um controle negativo para verificar a esterilidade da amostra. A nistatina foi usada como controle positivo com concentração de 2,5µg/mL para o fungo, enquanto para as bactérias o controle positivo foi a Amoxicilina em concentrações que variam de 32 µg/mL até 128 µg/mL, variando do microrganismo. As placas foram então incubadas a 35°C por 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata. A CIM foi definida como a menor concentração dos complexos que inibiu o crescimento das bactérias e dos fungos, observada visualmente pela ausência de turvação. Todas as análises foram conduzidas em duplicata e replicadas em três experimentos independentes.

#### **4.2.6 Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

A CBM e CFM foram conduzidas com base em modificações do método proposto por Spencer *et al.*, (2004). 10 µL das amostras foram retiradas das placas que não apresentavam crescimento visível no ensaio de CIM. Essas amostras foram posteriormente distribuídas em placas de ágar Mueller-Hinton (bactérias) e Sabouraud dextrose (fungos), que foram então incubadas a uma temperatura de 36°C e 35°C, respectivamente, por um período de 24 horas.

#### **4.2.7 Curva de crescimento microbiano**

O experimento foi realizado conforme o método de Babii *et al.* (2016), com modificações, para explorar o efeito do carvacrol no valor de CIM na curva de crescimento microbiano. Primeiramente, as linhagens de fungos e bactérias foram cultivadas previamente. Os inóculos foram preparados diluindo as culturas em água estéril até atingir uma concentração de  $10^6$  UFC/mL, seguindo a escala padrão de 0,5 McFarland para bactérias e 1,0McFarland para fungos. Então, 1,1 mL dos inóculos foi adicionado a tubos contendo caldo RPMI-1640 e carvacrol na sua concentração inibitória mínima, resultando numa concentração final de  $10^5$  UFC/mL, e foram incubados a 35°C. A absorbância foi medida a 600 nm nos tempos 0, 4, 8, 12, 24, 30, 36 e 48 horas no intuito de avaliar a atividade da substância nas variadas etapas do

estabelecimento do microrganismo. A nistatina na CIM foi usada como controle positivo. Além disso, as linhagens fúngicas inoculadas em caldo RPMI-1640 serviram como controle de crescimento. O experimento foi replicado três vezes. Com base nos resultados, no software GraphPad Prism, foram criados dois gráficos: um mostrando a absorbância em função do tempo de incubação e outro representando a área sob a curva.

#### **4.2.8 Ação em envoltório celular**

A metodologia foi realizada de acordo com Campos *et al.* (2018). A linhagem fúngica utilizada foi incubada em meio RPMI 1640 a 35°C por 24h e a linhagem bacteriana em meio MH a 36°C por 24h. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 1000 rpm por 5 min, lavada e ressuspensa em solução de Salina Tamponada com Fosfato (PBS) a 10 mM (pH 7,4), alcançando uma densidade final de  $3 \times 10^6$  UFC/mL. Os microrganismos foram incubados com carvacrol (valor de CIM), Amoxicilina (bactérias) ou Nistatina (fungos) em diferentes tempos (0, 1, 2, 3 e 4 h). Como controle, foram utilizadas células incubadas com PBS a 10 mM (pH 7,4). Os sobrenadantes obtidos das suspensões foram centrifugados a 3000 rpm por 15 min e analisados a 260 nm. Após 4 h, as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry (1951). Os procedimentos foram realizados em triplicata.

Após um período de 4 horas, os sobrenadantes foram coletados e a quantificação foi realizada seguindo uma adaptação do método de Lowry (1951). Inicialmente, 10 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio contendo água e 2 mL de solução reagente (2% de tartarato de sódio e potássio, 1% de sulfato de cobre e uma solução alcalina de NaOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Após a homogeneização, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, 2 mL da solução de Folin foram adicionados. Os tubos foram novamente homogeneizados e deixados em repouso por mais 30 minutos. Posteriormente, uma alíquota de cada tubo foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita a 660 nm em um espectrofotômetro. As absorbâncias foram comparadas com uma curva de calibração de albumina preparada no mesmo dia. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### 4.2.9 Avaliação da atividade antibiofilme

##### 4.2.9.1 Ação sobre biofilmes na fase de proliferação

O impacto sobre o biofilme preexistente foi acessado conforme a metodologia previamente delineada por Nostro *et al.* (2007), com ajustes específicos. As linhagens de microrganismos foram cultivadas em formato de biofilme empregando um meio de cultura contendo 1% de glicose, dispostas em placas de microtitulação fabricadas em poliestireno com 96 poços, mantidas em incubação de 35°C a 36°C por um período de 24 horas. Posteriormente, procedeu-se à remoção das células na fase planctônica, seguida de uma tripla lavagem dos poços com água, seguida do preenchimento destes com 200 µL de carvacrol, chegando à CIM. A densidade ótica (DO) a 600 nm foi registrada após um subsequente período de incubação de 24 horas a 35°C. O grupo de controle de biofilme consistiu de placas contendo o meio de cultura CSD e inóculo. Este experimento foi repetido em triplicata. A redução da inibição do biofilme foi calculada pela seguinte fórmula: % de inibição =  $(DO \text{ no controle} - DO \text{ em tratamento}) \times 100 / DO \text{ no controle}$ . Cada teste foi realizado em triplicata.

##### 4.2.9.2 Ação sobre biofilmes na fase de adesão

A avaliação da inibição na formação de biofilmes foi conduzida utilizando um ensaio espectrofotométrico, seguindo o protocolo estabelecido por Plyuta *et al.* (2013). Inicialmente, 100 µL de suspensões celulares dos microrganismos (com uma concentração de  $3 \times 10^6$  UFC/mL) foram adicionadas em placas de microtitulação feitas de poliestireno contendo 96 poços. Em seguida, diferentes concentrações de carvacrol (com valores de CIM) foram incorporadas às placas, e estas foram mantidas em incubação de 35°C a 36°C por um período de 24 horas. Após a incubação, as soluções líquidas foram retiradas, e os poços foram submetidos a uma lavagem com 200 µL de solução tampão fosfato salino (PBS) para eliminar quaisquer fungos que estivessem em suspensão. Os biofilmes formados por células aderentes nas superfícies das placas foram corados com 200 µL de solução de cristal violeta a 0,1% e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Qualquer excesso de cristal violeta foi removido completamente com PBS, e as placas foram fixadas com 200 µL de etanol a 96% e incubadas por 15 minutos.

A mistura reacional resultante foi então avaliada por espectrofotometria a uma absorbância de 570 nm. A redução da inibição do biofilme foi calculada pela seguinte

fórmula: % de inibição =  $(\text{DO no controle} - \text{DO em tratamento}) \times 100 / \text{DO no controle}$ .  
Cada teste foi realizado em triplicata.

#### 4.3 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA 1,0% (P/V)

O gel de quitosana a 1,0% (p/v) foi preparado pela solubilização de 1,0 grama de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético a 1% (v/v), mantendo o sistema sob agitação constante por 6 horas em agitador magnético. Para protonar o polímero foi utilizado Aminometil propanol (AMP 95), medindo o pH com pHmetro. Foram preparados três géis separados contendo, respectivamente, 0,1%, 0,5% e 1% de Carvacrol, além do gel branco.

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DO GEL DE QUITOSANA CONTENDO CARVACROL

##### 4.4.1 Teste preliminar de estabilidade

Conforme orientado pelo guia de estabilidade de cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2024), o gel deve passar pelo teste de centrifugação a 3.000 rpm por 30 minutos antes de iniciarem as avaliações de estabilidade. O produto precisa se manter estável; qualquer indicação de instabilidade sugere a necessidade de reformulação. Caso o produto seja aprovado nestes testes, ele pode então ser submetido aos testes de estabilidade. O teste de estabilidade preliminar do gel foi conduzido utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente nas concentrações de 10% e 20%, bem como Tween 80 nas concentrações de 0,5% e 1%, sendo avaliado qual apresentaria melhor estabilidade pós centrifugação. A exposição das formulações às temperaturas de 2°C, 25°C e 40°C para avaliar formação de dissociação em fases ou precipitação também foi conduzida por 7 dias. O gel com maior estabilidade foi eleito para realização dos testes seguintes.

##### 4.4.2 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do Infravermelho (FTIR)

Para analisar as possíveis interações intermoleculares entre carvacrol e a quitosana, foi conduzido um ensaio de espectroscopia vibracional na faixa do infravermelho utilizando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier. As amostras, incluindo carvacrol e quitosana, foram examinadas utilizando um acessório de refletância total atenuada (ATR) da marca PIKE, acoplado ao espectrômetro. Cada amostra foi aplicada diretamente na superfície de diamante do módulo ATR e os espectros foram obtidos a partir da média de 64 varreduras

consecutivas, com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , cobrindo uma faixa de número de onda de  $4500\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ . A aquisição dos espectros foi realizada com o software Perkin Elmer Spectrum Two, da OXFORD Instruments, e os dados foram exportados e processados no OriginPro 9.0®

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMULAÇÃO *IN VITRO*

##### 4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço

A suscetibilidade antimicrobiana foi analisada usando o método de difusão em disco, conforme as recomendações do CLSI (2009), com algumas modificações. Discos estéreis de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 20  $\mu\text{L}$  de cada extrato a ser testado e, em seguida, colocados com uma pinça estéril sobre placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH), previamente inoculadas com o micro-organismo alvo. No teste de difusão em disco, foram considerados inibitórios os halos com diâmetro igual ou superior a 6 mm. O teste de difusão em poço foi conduzido de acordo com as atualizações do CLSI (2009), com adaptações. Diferente do teste de disco, foram feitos três orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de cultura de ágar MH em placas de Petri, utilizando um molde para formar os poços. As placas foram inoculadas na superfície com os microrganismos usando um swab, e os poços foram preenchidos com 20  $\mu\text{L}$  do extrato na concentração a ser testada. Em ambos os testes, as placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com uma régua milimetrada.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas utilizando uma análise de variância (ANOVA) para experimentos dispostos de maneira completamente aleatória, com o cálculo da estatística F e os valores de p correspondentes. Quando os valores de p foram inferiores a 0,05, as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPrism 5.0, e a diferença mínima significativa foi calculada com um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

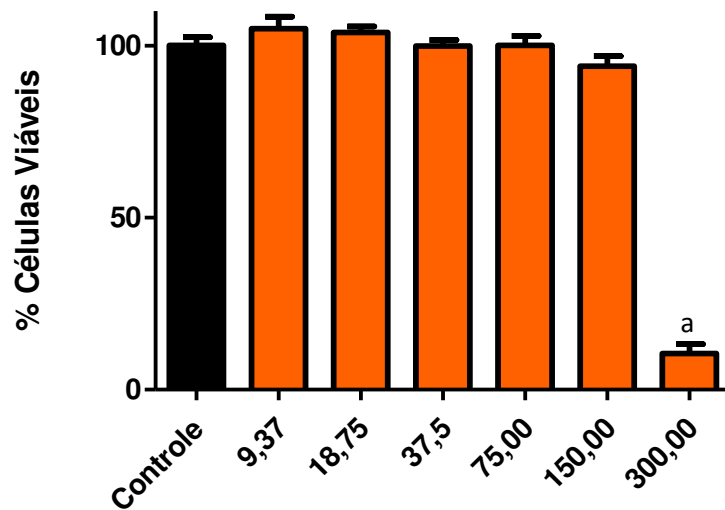
### 5.1. ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CARVACROL *IN VITRO*

A análise da citotoxicidade do carvacrol foi realizada com o intuito de examinar a viabilidade celular dessas linhagens, utilizando o teste de redução do MTT para formazan, que resulta em uma coloração púrpura. A quantidade de formazan produzida está diretamente relacionada ao número de células viáveis, uma vez que o MTT é clivado exclusivamente por células vivas e metabolicamente ativas (Mosmann *et al.*, 1983). Seguindo as diretrizes da NBR ISO 10993-5, ao avaliar a citotoxicidade *in vitro* de uma substância, é crucial que a porcentagem de viabilidade celular não seja inferior a 70%.

De acordo com os resultados apresentados na figura 11, pode-se observar que carvacrol não apresentou citotoxicidade para macrófagos peritoneais, nas concentrações testadas, com exceção da maior concentração testada (300 µg/mL), tendo o mesmo perfil que o controle negativo, DMSO 0,06% ( $p > 0,05$ ). Os resultados encontrados através dos testes de citotoxicidade realizados com as substâncias dialogam com outros estudos previamente publicados que utilizam a polpa dentária humana e testes MTT para análise da viabilidade celular, estes que destacam o Carvacrol com citotoxicidade considerável *in vitro* apenas em concentrações mais elevadas, reconhecendo seus demais efeitos bioativos (Maquera-Huacho *et al.*, 2018; Ranjitkar *et al.*, 2021).

A Figura 12 apresenta a citotoxicidade do carvacrol frente a seu uso em fibroblastos, constatando citotoxicidade elevada apenas na concentração mais alta.

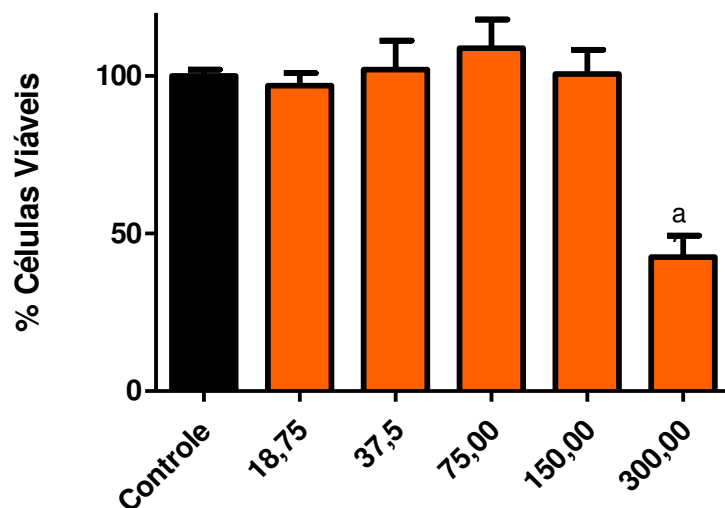
**Figura 11: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais após tratamento com carvacrol**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: Macrófagos peritoneais tratados com carvacrol isolado foram avaliados de acordo com a porcentagem de inibição. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular. Foi verificada diferença estatisticamente significativa para a concentração de 300mcg/ml em relação ao controle negativo, não sendo evidenciada em nenhuma das concentrações subsequentes. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). Os testes foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP

**Figura 12: Viabilidade celular de fibroblastos após tratamento com carvacrol**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: Fibroblastos L929 tratados com carvacrol foram avaliados de acordo com a porcentagem de inibição. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular. Foi verificada diferença estatisticamente significativa para a concentração de 300mcg/ml de carvacrol, em relação ao controle negativo, não sendo evidenciada em nenhuma das concentrações subsequentes. Os testes foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

Um antioxidante apresenta a habilidade de retardar ou prevenir a oxidação de um substrato, podendo atuar de várias formas, como doação de um átomo de hidrogênio, transferência de elétrons e quelamento de metais de transição (Santos-Sanchés *et al.*, 2019). Durante o metabolismo celular, surgem intermediários parcialmente oxidados, altamente reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas, que consistem em radicais livres ou seus precursores, possuem elétrons desemparelhados em um orbital, o que as torna propensas a reagir com outras moléculas biológicas para compensar essa deficiência (Santos-Sanchés *et al.*, 2019).

Embora desempenhem uma função benéfica no processo de cicatrização, a produção excessiva de eROS por períodos prolongados está associada ao desenvolvimento de feridas crônicas de cicatrização difícil, devido à sua elevada reatividade com moléculas biológicas. Além de mediar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , e induzir metaloproteinases da matriz (MMPs), o excesso de eROS pode alterar e/ou degradar diretamente e indiretamente proteínas da matriz extracelular, resultando em danos à função de fibroblastos e queratinócitos. Portanto, substâncias capazes de modular a produção excessiva de eROS desempenham um papel crucial no processo de cicatrização de feridas (Dunnill *et al.*, 2017; Larouche *et al.*, 2022).

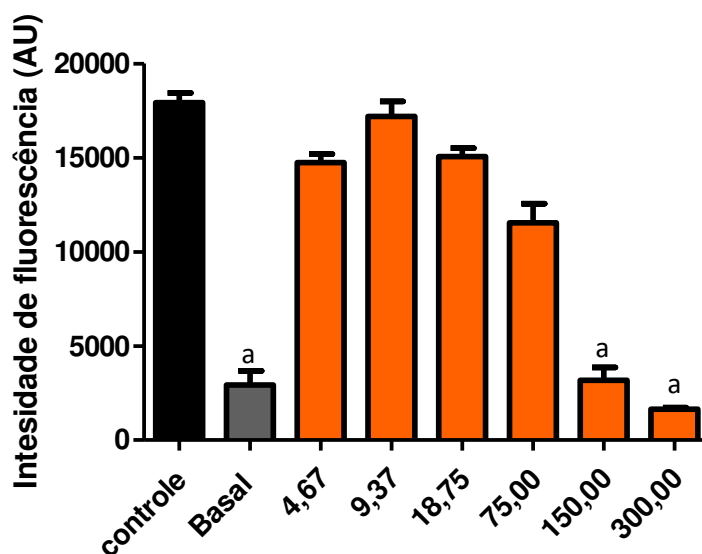
Dessa forma, a influência do tratamento com carvacrol sobre os níveis intracelulares de eROS em macrófagos foi analisada utilizando espectrofluorimetria, com os resultados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (A.U). A Figura 13 mostra uma redução de 35,62%, 82,25% e 90,32% na produção de eROS em células tratadas com concentrações de 75 a 300  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), evidenciando uma diminuição proporcional na produção de eROS conforme o aumento da concentração da substância no meio. Não houve diferença estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência entre as concentrações de 150 e 300  $\mu\text{g/mL}$  de carvacrol, enquanto todos os outros grupos apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ). Foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os níveis basais de eROS e aqueles produzidos pelas células tratadas com concentrações menores de carvacrol (de 4,67 a 75  $\mu\text{g/mL}$ ).

Em um estudo conduzido por Hossein Salmani *et al.*, (2022) onde a mesma metodologia utilizada neste trabalho para avaliação da concentração de eROS no sobrenadante foi utilizada (oxidação de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ), constatou-se queda

estatisticamente significativa no doseamento dessas espécies, bem como outros estudos previamente conduzidos com metodologias variadas (Guimarães *et al.*, 2010).

Os macrófagos ativados geram eROS, essenciais para combater agressões, mas também envolvidas em outros processos fisiológicos, como sinalização e proliferação celular. Os efeitos pró-inflamatórios do LPS, incluindo a ativação de ERK<sub>1/2</sub>, NF- $\kappa$ B, produção de NO e fagocitose, estão associados ao aumento de eROS. Durante a ativação de macrófagos, as eROS são principalmente geradas pela ativação da NADPH oxidase na fagocitose. A interação do TLR<sub>4</sub> com a subunidade Nox<sub>4</sub> da NADPH oxidase está envolvida na geração de eROS mediada por LPS e ativação de NF- $\kappa$ B (Park *et al.*, 2004). Como a produção de eROS está ligada à ativação do estado pró-inflamatório, as propriedades antioxidantes do carvacrol podem explicar a maioria dos seus efeitos anti-inflamatórios.

**Figura 13: Avaliação dos níveis intracelulares de eROS por espectrofluorimetria em macrófagos tratados com diferentes concentrações de carvacrol**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: Macrófagos peritoneais tratados com carvacrol nas concentrações de 4,67 a 300,00  $\mu$ g/mL por 48h e estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . As concentrações intracelulares de eROS foram avaliadas após coloração com H2DCFDA e leitura feita em espectrofluorímetro. CV: Carvacrol. Basal: células que não receberam estímulo e tratamento. Controle: células estimuladas, mas sem receber tratamento. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

O óxido nítrico é um radical livre que desempenha um papel fundamental no desdobramento do processo inflamatório, atuando como um mediador-chave. Ele é gerado por várias células envolvidas no ciclo de cicatrização, como macrófagos, linfócitos, queratinócitos e fibroblastos. A produção desse composto está associada ao aumento da permeabilidade vascular, à liberação de citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$ ,

influenciando ainda a migração de células inflamatórias, a proliferação e a diferenciação de linfócitos T. Pesquisas indicam que tanto a escassez quanto o excesso de produção de óxido nítrico podem ser prejudiciais para o processo de cicatrização. Embora a inflamação desempenhe um papel vital na defesa do organismo, uma resposta exacerbada ou prolongada pode ocasionar danos irreparáveis aos tecidos (Bernatchez *et al.*, 2013; de Farias *et al.*, 2020).

O desacoplamento de sintases de óxido nítrico pode alterar a atividade enzimática, o que favorece a produção de ROS, como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).  $O_2^{\cdot-}$  então pode reagir com NO biodisponível para produzir peroxinitrito, que desempenha um papel importante na citotoxicidade por induzir vias de radicais livres ou por interagir diretamente com lipídios, proteínas e DNA. Não importa a via, o estresse oxidativo aumenta controla a lesão oxidativa das células, causando necrose ou apoptose. Portanto, NO atua como um modular do estresse oxidativo e pró-inflamatório concomitantemente (Awonuga *et al.*, 2023)

A dosagem indireta de NO foi realizada no sobrenadante da cultura de macrófagos tratados com concentrações crescentes de carvacrol (18,75 a 300,00  $\mu\text{g/mL}$ ), as mesmas utilizadas no ensaio de viabilidade celular. Os resultados foram expressos em micromolar ( $\mu\text{M}$ ) de acordo com o apresentado na Figura 14. As células tratadas com carvacrol nas concentrações iguais e superiores a 75  $\mu\text{g/mL}$ , tiveram uma redução estatisticamente significativa na dosagem de NO ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao controle negativo (Figura 14).

No presente estudo, a dosagem indireta de NO foi aplicada ao sobrenadante da cultura de macrófagos murinos estimulados com LPS e INF- $\gamma$  e tratados com concentrações de carvacrol aumentadas de 9,37 a 300,00  $\mu\text{g/mL}$ . As concentrações de carvacrol utilizadas no ensaio de viabilidade celular foram as mesmas. O fator de transcrição fator nuclear B (Nf-kB) e a expressão de óxido nítrico sintase são ativados pelo LPS ao se conectar aos receptores CD14, TLR-4 e CR3 encontrados na superfície dos macrófagos. O INF- $\gamma$ , por outro lado, é uma citocina que ativa macrófagos e desencadeia reações inflamatórias (Chang *et al.*, 2019).

As células tratadas com concentrações iguais ou superiores a 75,00  $\mu\text{g/mL}$  de carvacrol, tiveram os níveis de NO reduzidos de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle (75,00  $\mu\text{g/mL}$ : -32,21%; 150,00  $\mu\text{g/mL}$ : -97,17%; 300,00  $\mu\text{g/mL}$ : -100%) o que também corrobora com a atividade antioxidante do carvacrol neste trabalho. Não houve diferença significativa entre a produção de NO nas células

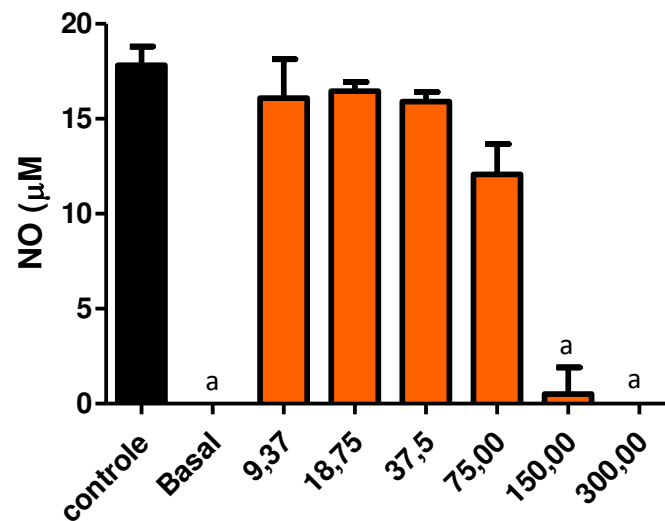
tratadas com 300,00 e 150,00 µg/mL de carvacrol e os níveis basais ( $p < 0,05$ ), sendo avaliada diferença entre os demais grupos. Os resultados foram expressos em micromolar (µM) de acordo com o apresentado na Figura 14.

Esses resultados corroboraram as análises feitas previamente no estudo conduzido por Somensi *et al.*, (2019), onde o carvacrol reduziu significativamente a ativação de ERK<sub>1/2</sub>, demonstrando que sua ação não ocorre a nível extracelular ou não interfere na ligação do LPS ao TLR<sub>4</sub>/CD<sub>14</sub>. Existe a possibilidade de que o carvacrol tenha um impacto específico na via Ras/Raf ou que funciona em vários receptores de membrana que também são influenciados pelo LPS.

No estudo supracitado, a dosagem de NO foi realizada através da mesma metodologia nesta dissertação, obtendo também resultado semelhantes através do doseamento de nitritos presentes no sobrenadante no sobrenadante, uma vez que, no corpo humano, são previamente encontrados na forma de NO até moverem-se ao meio extracelular e converterem-se em nitrito) (Somens *et al.*, 2019).

No estudo conduzido por Hossein Salmani *et al.*, (2022), o doseamento de NO foi realizado em tecido cerebral de ratos, onde a injeção de LPS aumentou significativamente o nível de TNF-α ( $p < 0,001$ ) e os níveis de metabólitos de NO ( $p < 0,01$ ) em comparação aos ratos controle. O carvacrol em todas as doses administradas (25, 50 e 100 mg/kg) diminuiu os níveis de TNF-α significativamente. Além disso, a concentração de NO no tecido cerebral de ratos tratados com carvacrol, em todas as doses, foi menor do que a dos ratos injetados com LPS, sugerindo atividade anti-inflamatória promissora.

**Figura 14: Produção de NO por macrófagos após tratamento com carvacrol**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: Macrófagos peritoneais tratados com CV nas concentrações de 18,75 a 300,00 µg/mL e induzidas com IFN-γ e LPS. A dosagem de NO produzido foi determinada pelo método de Griess. CV: Carvacrol. Basal: NO produzido por células que não receberam tratamento e estímulo. Controle: NO produzido por células tratadas com Dimetilsulfóxido (DMSO) (veículo) e induzidas com LPS e IFN-γ. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

A reinfecção endodôntica é geralmente associada à persistência ou reintrodução de microrganismos no sistema de canais radiculares previamente tratado. Os microrganismos envolvidos, como bactérias anaeróbias facultativas e estritamente anaeróbias, desempenham papel fundamental na etiologia da reinfecção (Prada *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que espécies como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, devido à sua alta resistência a condições adversas, são frequentemente isoladas de casos de falhas endodônticas (Mozayeni *et al.*, 2015; Alghamdi *et al.*, 2020). Esses microrganismos têm a capacidade de aderir à dentina, formar biofilmes e sobreviver em ambientes com nutrientes limitados, como os encontrados nos canais radiculares selados inadequadamente (Van Tyne *et al.*, 2013; Neelakantan *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2017).

Além disso, a complexidade anatômica dos canais radiculares favorece a colonização por esses patógenos por predispor ambiente propício às suas instalações, mantendo-se como um ambiente escuro e com múltiplos sítios, dificultando então a capacidade de toque das limas nas paredes do canal, chegada

da substância química auxiliar, medicação intracanal e obturação, facilitando a reinfecção (Tabassum *et al.*, 2016; Prada *et al.*, 2019).

Em complemento, espécies enterocócicas são comumente associadas à falha de tratamentos endodônticos devido à sua capacidade de resistir ao hidróxido de cálcio, um agente amplamente utilizado como medicação intracanal. O hidróxido de cálcio atua criando um ambiente altamente alcalino, com pH entre 11 e 12, que é letal para a maioria dos microrganismos. No entanto, microrganismos comumente associados a infecções persistentes possuem mecanismos de resistência a medicações intracanal como a capacidade de regulação do pH intracelular, reduzindo a eficácia do Hidróxido de Cálcio, por exemplo (Zancan *et al.* 2016; Paikkatt *et al.*, 2017; Zancan *et al.*, 2018).

Algumas espécies enterocócicas, por exemplo, possuem bombas de prótons que conseguem expulsar íons  $H^+$ , mantendo o pH intracelular em níveis compatíveis com sua sobrevivência, mesmo em ambientes externos altamente alcalinos (Upadya *et al.*, 2011).

Neste sentido, reconhecendo que o hidróxido de cálcio é a substância mais difundida na endodontia como medicação intracanal mas possui limitações consideráveis frente a microrganismos frequentemente associados à infecções persistentes, a busca por alternativas tem sido fomentada, especialmente para elevar a taxa de sucesso em retratamentos endodônticos.

Neste estudo, o carvacrol demonstrou eficácia contra *C. albicans* ATCC® 10321™ com valor de CIM de 200 µg/ml, tendo efeito fungistático. Também foi observado que carvacrol apresentou valores de CIM de 100 µg/mL para as linhagens bacterianas de interesse, apresentando efeito bactericida para *E. faecalis* ATCC® 19433™ e bacteriostático para *E. faecium* ATCC® 6569™ e *S. oralis* ATCC® 10557™ nestas concentrações.

O controle positivo utilizado para as linhagens bacterianas foi a amoxicilina, que constatou CIM consideravelmente alta, sendo constatado CIM de 128µg/ml para *S. oralis* ATCC® 10557™ (superior à CIM do carvacrol), 64µg/ml para *E. faecium* ATCC® 6569™ e 32 µg/ml para *E. faecalis* ATCC® 19433™, valores possivelmente associados à utilização inadvertida deste antibiótico (Loyola-Rodriguez *et al.*, 2019).

Valores elevados de CIM obtidos através de metodologia de microdiluição também foram obtidos no estudo conduzido por He *et al.*, (2022), onde a amoxicilina apresentou concentrações inibitórias mínimas majoritariamente superiores ou iguais

a 16 e 32µg/ml contra *Mycobacterium abscessus*, sendo classificada com elevado grau de resistência contra o microrganismo em questão.

Os achados obtidos com carvacrol foram similares aos descobertos no estudo realizado por Samah Mechmechani *et al.*, (2023), no qual a cepa *E. faecalis* foi mais suscetível ao carvacrol com um valor de concentração inibitória mínima de 0,625 mg/mL<sup>-1</sup>. Durante o teste de sobrevivência, uma população bacteriana de cerca de 8 log UFC/mL<sup>-1</sup> foi exposta à CIM de carvacrol. Os resultados evidenciaram que, ao utilizar os valores de CIM do carvacrol para cada cepa, não foi observada nenhuma célula viável após apenas 1 minuto de tratamento para a cepa *P. aeruginosa* e 5 minutos de tratamento para a cepa *E. faecalis*.

Estudos realizados utilizando carvacrol contra cepas de *C. albicans* relataram que o carvacrol pode interferir na biossíntese do ergosterol, o que afeta a integridade da membrana plasmática (Ahmad *et al.*, 2011). Em contraste, no estudo conduzido por Niu *et al.*, (2020) foi avaliado o efeito do carvacrol nas membranas celulares de *C. albicans*, sendo a integridade e o potencial da membrana celular analisados usando coloração PI e DiBAC 4.

A análise de coloração revelou sinal de fluorescência notavelmente intenso em células tratadas com carvacrol 247 µg/ml em comparação com células de controle, indicando que o carvacrol interrompeu a integridade da membrana celular do microrganismo. Estes resultados demonstram atividade antimicrobiana promissora desta substância, demonstrando efetividade *in vitro* contra microrganismos frequentemente correlacionados a falhas endodônticas e resistência a medicações intracanaais convencionais.

**Tabela 1: Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima**

| Amostra     | Microorganismos                    | CIM<br>(µg/mL) | Efeito no valor de<br>CIM | CFM/CBM<br>(µg/mL) |
|-------------|------------------------------------|----------------|---------------------------|--------------------|
| Carvacrol   | <i>C. albicans</i> ATCC®<br>10321™ | 200            | Fungistático              | >200               |
|             | <i>E. faecium</i> ATCC®<br>6569™   | 100            | Bacteriostático           | >200               |
|             | <i>E. faecalis</i> ATCC®<br>19433™ | 100            | Bactericida               | 100                |
|             | <i>S. oralis</i> ATCC®<br>10557™   | 100            | Bacteriostático           | >200               |
| Nistatina   | <i>C. albicans</i> ATCC®<br>10321™ | 2,5            | Fungistático              | >2,5               |
| Amoxicilina | <i>E. faecium</i> ATCC®<br>6569™   | 64             | Bacteriostático           | > 64               |
|             | <i>E. faecalis</i> ATCC®<br>19433™ | 32             | Bactericida               | 32                 |
|             | <i>S. oralis</i> ATCC®<br>10557™   | 128            | bacteriostático           | > 128              |

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima; CFM – concentração fungicida mínima;

CBM – concentração bactericida mínima

O ensaio da curva de crescimento bacteriano e fúngico avaliou o comportamento das quatro linhagens microbiológicas empregadas no estudo em presença de carvacrol na concentração inibitória mínima. Sem a reposição de nutrientes ou substâncias antimicrobianas no meio, a curva de crescimento microbiano apresenta quatro fases distintas: *lag* (adaptação), *log* (crescimento exponencial), estacionária e declínio (morte celular). A relação entre o tempo e o logaritmo do número de células microbianas, ou a absorbância a 600 nm, possibilita a observação do crescimento e morte dos microrganismos em diferentes concentrações. Esse método tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito de antimicrobianos ao longo de um intervalo de tempo, observando em qual etapa de das fases de instalação do microrganismo o composto de interesse interfere (Foerster *et al.*, 2016).

O teste de difusão em ágar é, historicamente, amplamente utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana de medicamentos intracanaís (Saatchi *et al.*, 2014), entretanto, optou-se pela metodologia da análise de curva de crescimento, visto que o teste de difusão em ágar demonstra limitações que podem comprometer a interpretação e não possibilitar a análise de determinadas variáveis (Bonev *et al.*, 2008; Sy *et al.*, 2021).

As limitações mencionadas acima incluem reações químicas entre os componentes do ágar e o agente antimicrobiano e impossibilidade de distinção entre

atividade bactericida ou bacteriostática. Outras variações podem ocorrer devido à espessura do gel de ágar, que influencia a difusão do agente antimicrobiano, e à escolha do tamanho de corte para medir as zonas de inibição, o que pode introduzir imprecisões nos ensaios de susceptibilidade antimicrobiana (Bonev *et al.*, 2008; Ingle *et al.*, 2008).

Os resultados da cinética de crescimento bacteriano e fúngico das linhagens de *E. faecium* ATCC® 6569™, *E. faecalis* ATCC® 19433™, *S. oralis* ATCC® 10557™ e *C. albicans* ATCC® 10321™ na presença de carvacrol (valor de CIM) foi observada por 48 horas e estão representadas nas Figuras 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

O carvacrol e a amoxicilina afetaram a curva de crescimento do *E. faecium*, os resultados foram dispostos na Figura 15. Para os dois compostos, foi possível avaliar prolongamento da fase de adaptação do horário 4 até 8 horas, iniciando-se a fase exponencial entre 8 e 12 horas. A amoxicilina induziu o início da fase de declínio celular de forma antecipada, iniciando-se a partir da hora 8 e prolongando-se até o horário final. Em contrapartida, com o uso do carvacrol foi possível verificar início da fase estacionária na hora 12, prolongando-se até a hora 24, onde iniciou-se então o início da fase de declínio que se continuou até o horário final. Em termos de redução da área sob a curva de crescimento, a amoxicilina reduziu a área em 92% ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o carvacrol reduziu 65,57% ( $p \leq 0,05$ ) de sua área em relação ao controle de crescimento.

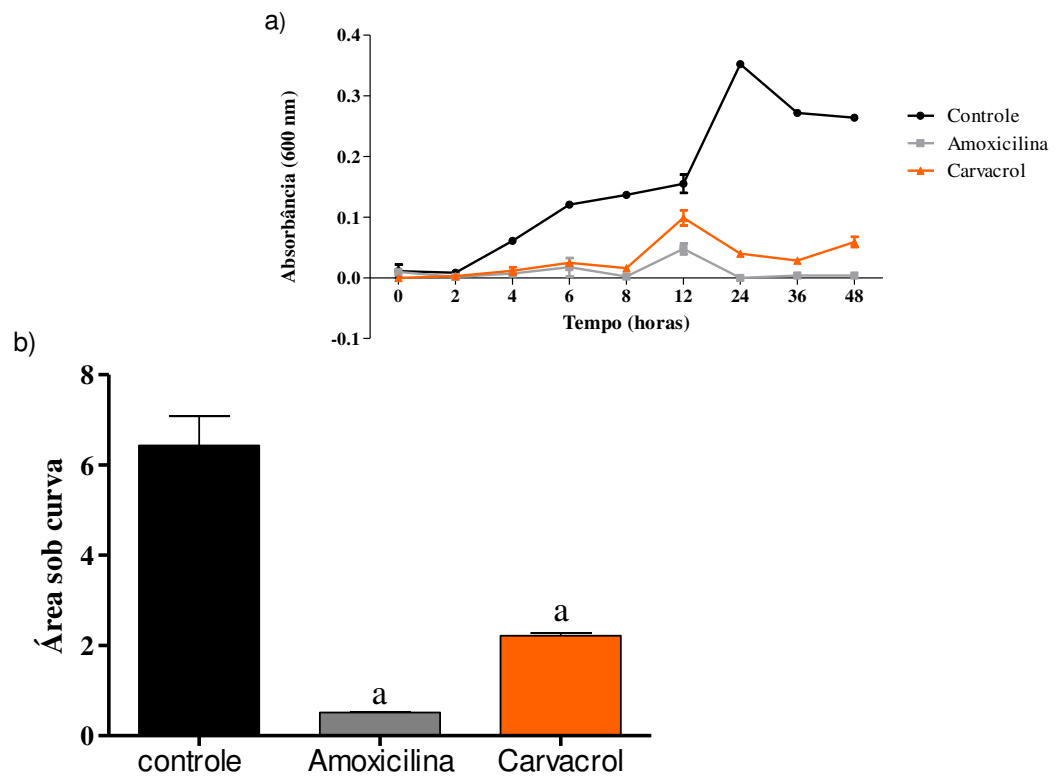
Na Figura 16, observou-se que o carvacrol prolongou a fase de adaptação de *E. faecalis* até a hora 6, dando início à fase exponencial entre as horas 6 e 8, seguida por uma fase estacionária até a hora 12. A partir da hora 24, a fase de declínio se iniciou e manteve-se estável até o horário final, indicando um efeito bactericida e sugestivo de morte celular, como evidenciado pelo teste de MBC. A amoxicilina também prolongou a fase de adaptação até a hora 6, com a fase exponencial ocorrendo entre as horas 8 e 12 e a estabilização até a hora 24. Da hora 24 até o horário final, observou-se a fase de declínio. Ambos compostos resultaram em uma densidade celular significativamente menor em comparação ao controle de crescimento, conforme medido pela densidade óptica. A amoxicilina reduziu a área sob a curva de crescimento em 89,54% ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o carvacrol reduziu em 89,71% ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação aos resultados apresentados na Figura 17, para *S. oralis*, o carvacrol prolongou a fase de adaptação até a hora 12, iniciando a fase exponencial

a partir desse ponto, com um número de células consideravelmente menor em comparação ao controle de crescimento. A amoxicilina impediu o início da fase exponencial, mantendo os microrganismos na fase de adaptação, sem crescimento no caldo do teste, mas com crescimento observável quando redistribuídos em ágar, evidenciando seu efeito bacteriostático. No controle de crescimento, a fase exponencial ocorreu entre as horas 4 e 36, enquanto com o carvacrol, iniciou-se na hora 12 e prolongou-se até a hora 48, sem declínio observado até a hora 36. A amoxicilina reduziu a área sob a curva de crescimento em 97,4% ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o carvacrol reduziu em 84,44% ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação aos resultados apresentados na Figura 18, para *C. albicans*, o carvacrol prolongou a fase de adaptação até a hora 24, iniciando uma discreta transição para a fase exponencial entre as horas 24 e 36, seguida pela fase de declínio entre as horas 36 e 48. Em contrapartida, a nistatina prolongou a fase de adaptação até a hora 12, com a fase exponencial iniciando a partir desse ponto e estendendo-se até o final do experimento. Ambos resultaram em uma densidade celular significativamente menor em comparação ao controle, conforme avaliado pela densidade óptica. O carvacrol apresentou um efeito fungistático no teste MFC, demonstrando eficácia, especialmente relevante para infecções persistentes mistas por *Candida* no sistema de canais radiculares. A redução da área sob a curva de crescimento foi de 46,76% ( $p \leq 0,05$ ) com a nistatina e de aproximadamente 98,61% com o carvacrol ( $p \leq 0,05$ ), mostrando um resultado consideravelmente promissor.

Figura 15: Curva de crescimento do carvacrol frente a *E. faecium* ATCC® 6569™

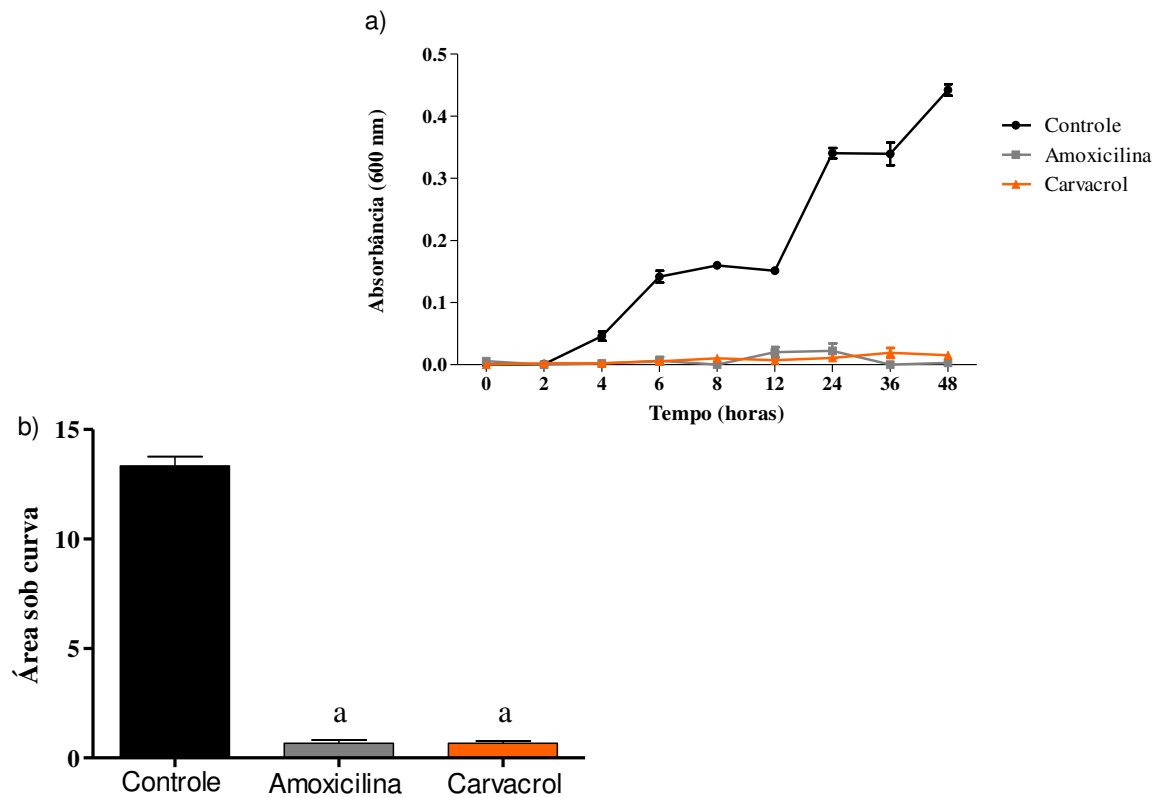


Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: O gráfico área sob curva representa as áreas sob as respectivas curvas. O gráfico com análise realizada por absorbância representa as curvas de crescimento dos grupos controle, tratamentos com amoxicilina e carvacrol. "a" sobre as colunas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A letra (a) ao lado do gráfico representa a curva de crescimento do microrganismo com ou sem exposição a amostras. A letra (b) representa o gráfico de área sobre curva do microrganismo com ou sem exposição a amostras.

(ANOVA seguido do pós-hoc test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

**Figura 16: Curva de crescimento do carvacrol frente a *E. faecalis* ATCC® 19433™**

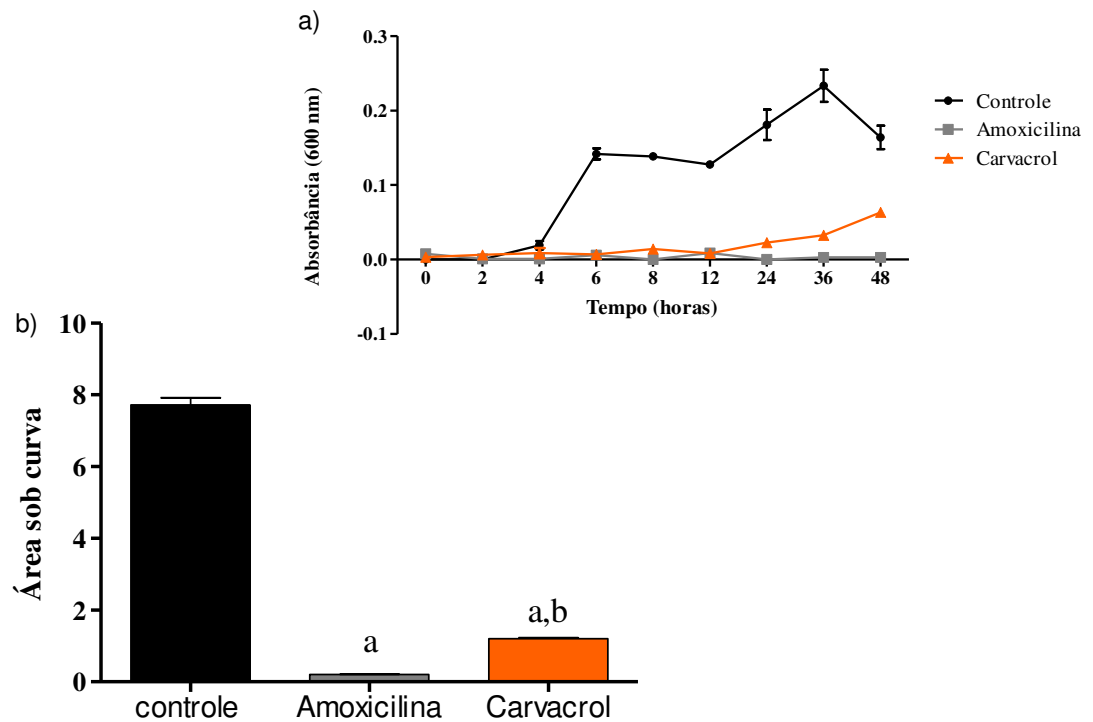


Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: O gráfico área sob curva representa as áreas sob as respectivas curvas. O gráfico com análise realizada por absorbância representa as curvas de crescimento dos grupos controle, tratamentos com amoxicilina e carvacrol. "a" sobre as colunas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A letra (a) ao lado do gráfico representa a curva de crescimento do microrganismo com ou sem exposição a amostras. A letra (b) representa o gráfico de área sobre curva do microrganismo com ou sem exposição a amostras.

(ANOVA seguido do pós-hoc test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

**Figura 17: Curva de crescimento do carvacrol frente a *S. oralis* ATCC® 10557™**

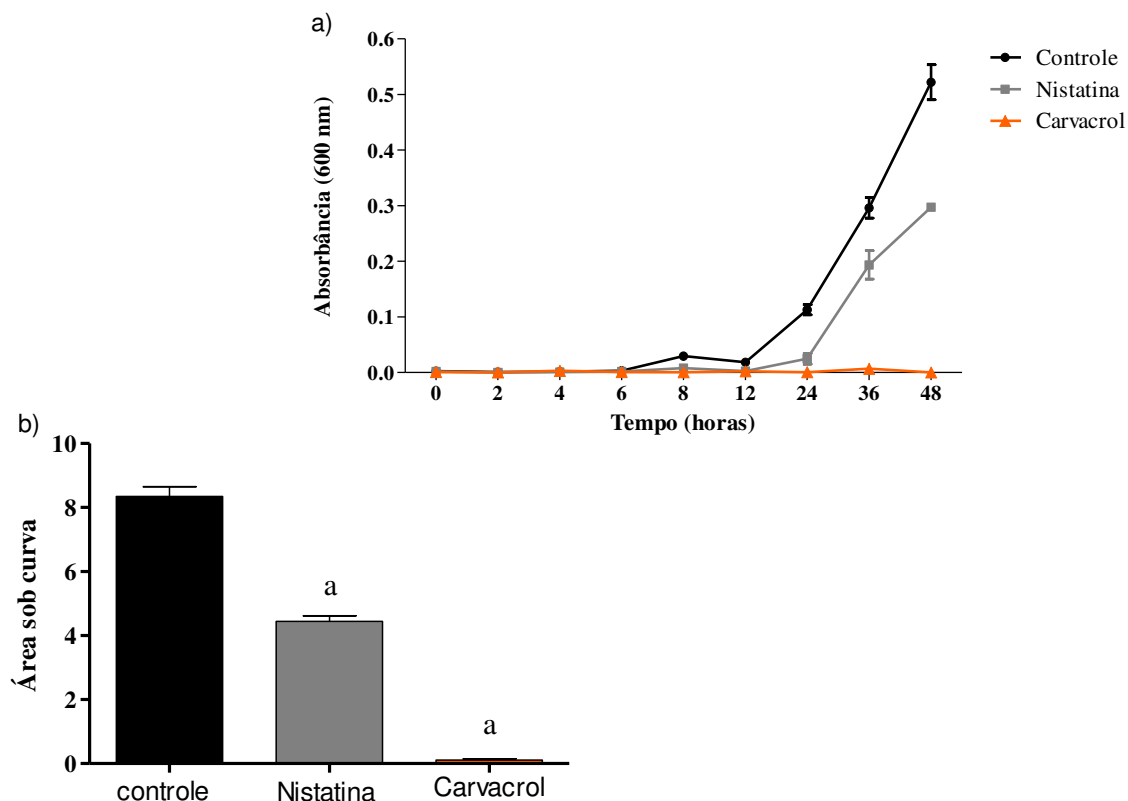


Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: O gráfico área sob curva representa as áreas sob as respectivas curvas. O gráfico com análise realizada por absorbância representa as curvas de crescimento dos grupos controle, tratamentos com amoxicilina e carvacrol. "a" sobre as colunas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A letra (a) ao lado do gráfico representa a curva de crescimento do microrganismo com ou sem exposição a amostras. A letra (b) representa o gráfico de área sobre curva do microrganismo com ou sem exposição a amostras.

(ANOVA seguido do pós-hoc test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

**Figura 18: Curva de crescimento do carvacrol frente a *C. albicans* ATCC® 10321™**



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: O gráfico área sob curva representa as áreas sob as respectivas curvas. O gráfico com análise realizada por absorbância representa as curvas de crescimento dos grupos controle, tratamentos com nistatina e carvacrol. “a” sobre as colunas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A letra (a) ao lado do gráfico representa a curva de crescimento do microrganismo com ou sem exposição a amostras. A letra (b) representa o gráfico de área sobre curva do microrganismo com ou sem exposição a amostras.

(ANOVA seguido do pós-hoc test de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

As Figuras 19, 20, 21 e 22 ilustram os efeitos do tratamento com carvacrol na permeabilidade celular de *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. oralis* e *C. albicans*, respectivamente, após 4 horas. Foi possível observar aumento no extravasamento de conteúdo intracelular em comparação ao controle e ao tratamento com nistatina, com exceção de *C. albicans*, especialmente após a segunda hora de tratamento. Os gráficos de coluna mostram um aumento significativo na área sob a curva para os microrganismos tratados com carvacrol em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

A Figura 19 representa como as amostras afetaram a permeabilidade celular de *E. faecium*. O tratamento com carvacrol e amoxicilina causou um aumento significativo no extravasamento de nucleotídeos, com aumentos de 25 vezes para carvacrol ( $p \leq 0,05$ ) e 10,5 vezes ( $p \leq 0,05$ ) para amoxicilina em comparação ao controle. Esse efeito também foi observado no doseamento de proteínas, com um

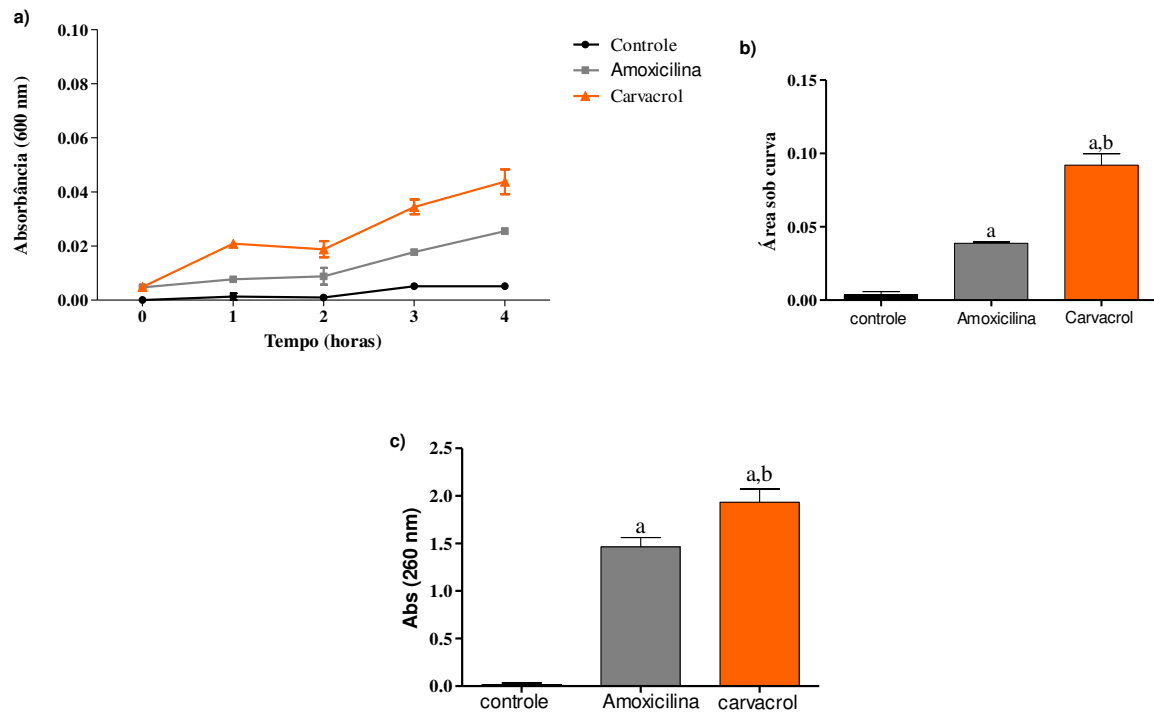
aumento de 120,2 vezes para o carvacrol ( $p \leq 0,05$ ) e 91,2 vezes para nistatina ( $p \leq 0,05$ ), apresentando significância estatística tanto em comparação ao controle quanto entre os tratamentos.

Em contraste, o extravasamento de proteínas de *E. faecalis* para o meio extracelular aumentou significativamente em relação ao controle, predispondo a um aumento de cerca de 2,2 vezes para ambos os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). Não foi encontrada diferença significativa entre os valores obtidos para carvacrol e amoxicilina. O extravasamento de nucleotídeos também aumentou cerca de 1,75 vezes para o grupo carvacrol e 1,35 vezes para o grupo amoxicilina em comparação ao controle, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 20).

Dentre todos os microrganismos utilizados e tratados com carvacrol e amoxicilina, apenas *S. oralis* não teve níveis significativamente aumentados tanto no extravasamento de nucleotídeos quanto de proteínas para o meio extracelular, sendo observada diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo amoxicilina e carvacrol.

O tratamento com carvacrol e nistatina resultou em um aumento significativo no extravasamento de nucleotídeos e proteínas de *C. albicans* em comparação ao controle. O extravasamento de nucleotídeos aumentou 42 vezes para o grupo carvacrol ( $p \leq 0,05$ ) e 43,4 vezes para o grupo nistatina ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o extravasamento de proteínas aumentou 7,2 vezes para carvacrol ( $p \leq 0,05$ ) e 4,8 vezes para nistatina ( $p \leq 0,05$ ). Apesar das diferenças estatísticas significativas, não foi encontrada uma diferença considerável entre os grupos tratados com carvacrol e nistatina.

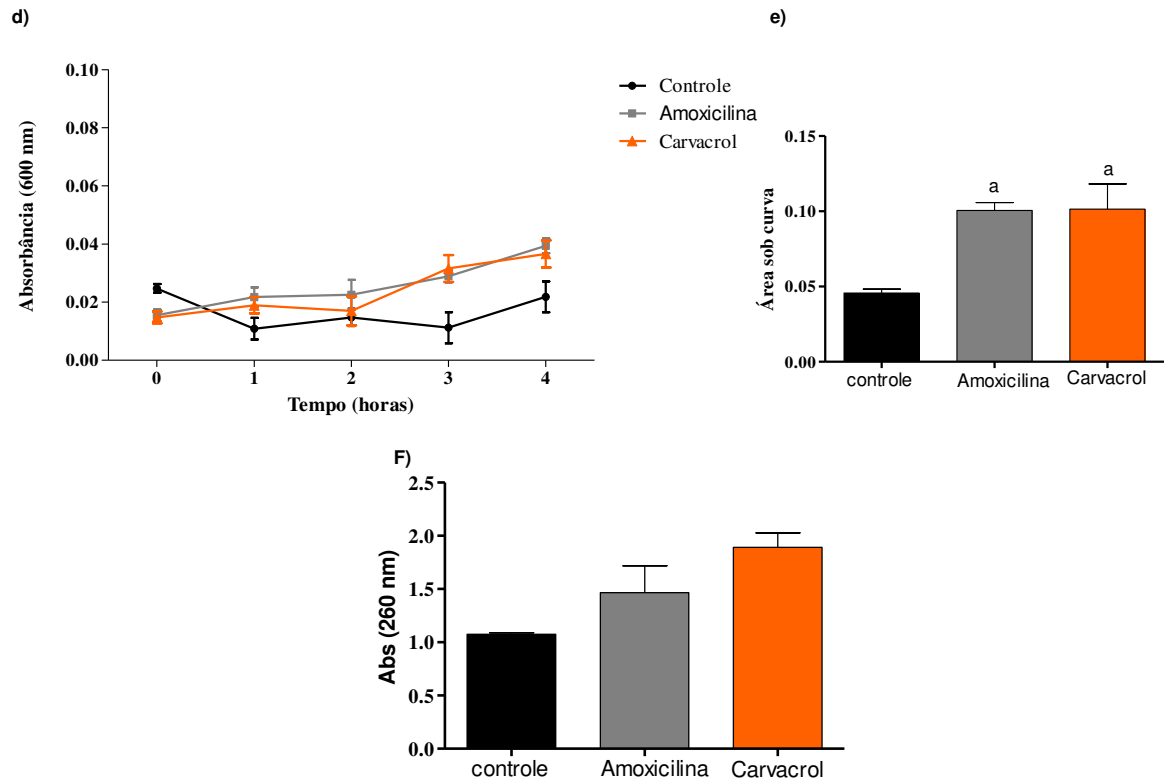
**Figura 19: ação do carvacrol em envoltório celular de *E. faecium* ATCC® 6569™**



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: Figura 19 - Liberação de conteúdo intracelular (nucleotídeos) e proteínas de *E. faecium* ATCC® 6569™ após exposição a CV em sua concentração inibitória mínima. (a) representa as curvas de extravasamento de material intracelular (nucleotídeos) para o meio, medido por densidade óptica a 260 nm por um período de 4 horas em intervalos de 1 hora. (b) Teor de proteínas após 4 horas de exposição com CV. (c) representa a área sob curva. “a” indica diferença estatística quando comparado ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

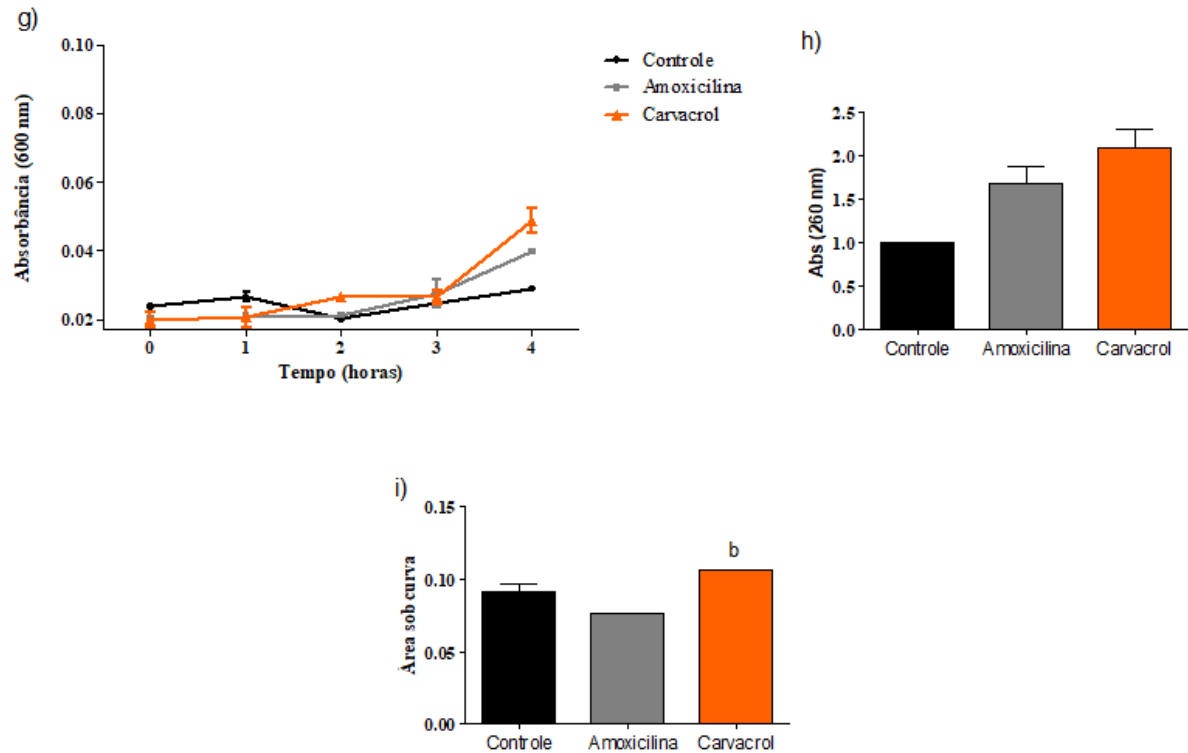
**Figura 20: ação do carvacrol em envoltório celular de *E. faecalis* ATCC® 19433™**



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: Figura 20 - Liberação de conteúdo intracelular (nucleotídeos) e proteínas de *E. faecalis* ATCC® 19433™ após exposição a CV em sua concentração inibitória mínima. (d) representa as curvas de extravasamento de material intracelular (nucleotídeos) para o meio, medido por densidade óptica a 260 nm por um período de 4 horas em intervalos de 1 hora. (e) Teor de proteínas após 4 horas de exposição com CV. (f) representa a área sob curva. “a” indica diferença estatística quando comparado ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

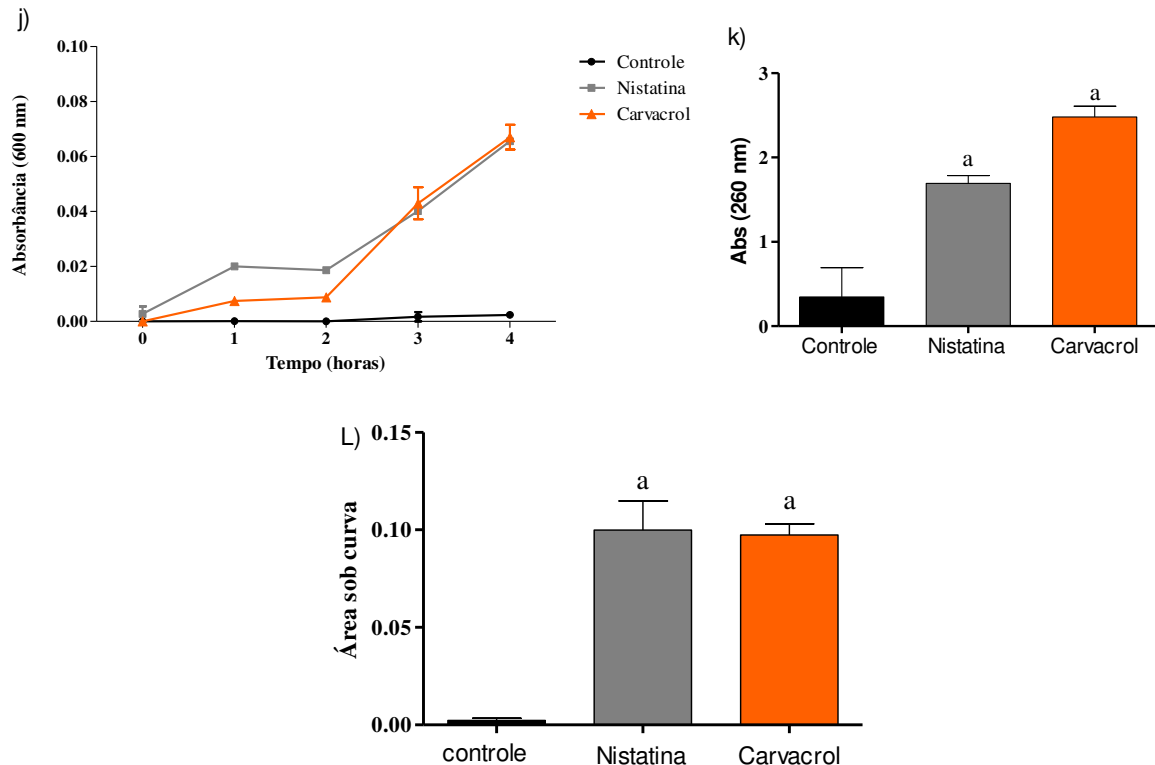
Figura 21: ação do carvacrol em envoltório celular de *S. oralis* ATCC® 10551™



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: Figura 21 - Liberação de conteúdo intracelular (nucleotídeos) e proteínas de *S. oralis* ATCC® 10551™ após exposição a CV em sua concentração inibitória mínima. (g) representa as curvas de extravasamento de material intracelular (nucleotídeos) para o meio, medido por densidade óptica a 260 nm por um período de 4 horas em intervalos de 1 hora. (h) Teor de proteínas após 4 horas de exposição com CV. (i) representa a área sob curva. "a" indica diferença estatística quando comparado ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

**Figura 22: ação do carvacrol em envoltório celular de *C. albicans* ATCC® 10321™**



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: Figura 22 - Liberação de conteúdo intracelular (nucleotídeos) e proteínas de *C. albicans* ATCC® 10321™ após exposição a CV em sua concentração inibitória mínima. (j) representa as curvas de extravasamento de material intracelular (nucleotídeos) para o meio, medido por densidade óptica a 260 nm por um período de 4 horas em intervalos de 1 hora. (k) Teor de proteínas após 4 horas de exposição com CV. (L) representa a área sob curva. "a" indica diferença estatística quando comparado ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

A avaliação do potencial antibiofilme de uma substância é crucial para compreender sua eficácia em condições que mais se aproximam da realidade clínica, onde os microrganismos frequentemente formam biofilmes, estruturas resistentes e protegidas que dificultam a ação antimicrobiana. Enquanto os ensaios com microrganismos em estado planctônico oferecem dados preliminares sobre a atividade antimicrobiana, estes não refletem a complexidade e a resistência intrínseca dos biofilmes comumente encontrados em infecções persistentes (Simões *et al.*, 2008; Neelakantan *et al.*, 2017).

Um biofilme é uma estrutura complexa que contém células bacterianas e é fixada a uma superfície por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida. Ele pode ser considerado uma camada de aglomeração da microbiota ou uma comunidade de microrganismos. Esta estrutura é formada por células que estão

fixadas a um substrato ou interface e imersas em uma matriz de proteínas extracelulares, polissacarídeos e eDNA, tendo sua composição variada de acordo com os microrganismos e nutrientes disponíveis; como resultado, os organismos têm taxas de crescimento e transcrição gênica diferentes (Neelakantan *et al.*, 2017).

A principal causa da falha do tratamento endodôntico é a persistência dos microrganismos dentro do sistema de canais radiculares após o tratamento, particularmente em estado de biofilme misto (Prada *et al.*, 2019). Após o tratamento do canal radicular, as proporções de microrganismos em infecções podem variar, bem como a propagação e a quantidade de espécies.

A microbiota encontrada em infecções secundárias e persistentes geralmente é capaz de sobreviver a condições adversas, como uma alta faixa de pH e baixas condições de nutrientes. É possível observar uma diferença marcante nos fenótipos microbianos nas infecções primárias e nas infecções secundárias, onde a maioria das bactérias são gram-positivas anaeróbios facultativos (Neelakantan *et al.*, 2017).

Os testes com biofilmes foram realizados com o intuito de avaliar a ação do carvacrol em diversas etapas de formação de um biofilme microbiano. Para isso, foram feitas análises que buscam impedir a etapa proliferativa do microrganismo e também que impeçam sua adesão a superfícies mediante uso da amostra de interesse nos biofilmes de população.

O carvacrol apresentou atividade antiproliferativa sobre o biofilme de proliferação para *E. faecium* proporcionando uma queda média de 69,6%, para *S. oralis* a média foi 72,44%, e 58,13% para *C. albicans* ( $p \leq 0,05$ ), verificado pela diminuição da densidade ótica, apresentando diferença estatisticamente significativa entre o grupo *E. faecium* e *C. albicans*. Em contrapartida, não evidenciou efeito antibiofilme para *E. faecalis*. O efeito do carvacrol impedindo o biofilme de adesão também foi observado para *E. faecium*, proporcionando queda média de 3,64% ( $p \geq 0,05$ ), e 27,81% ( $p \leq 0,05$ ) para a *C. albicans*, não sendo evidenciado efeito antiadesivo para *E. faecalis* e *S. oralis*. Os ensaios foram realizados em triplicata.

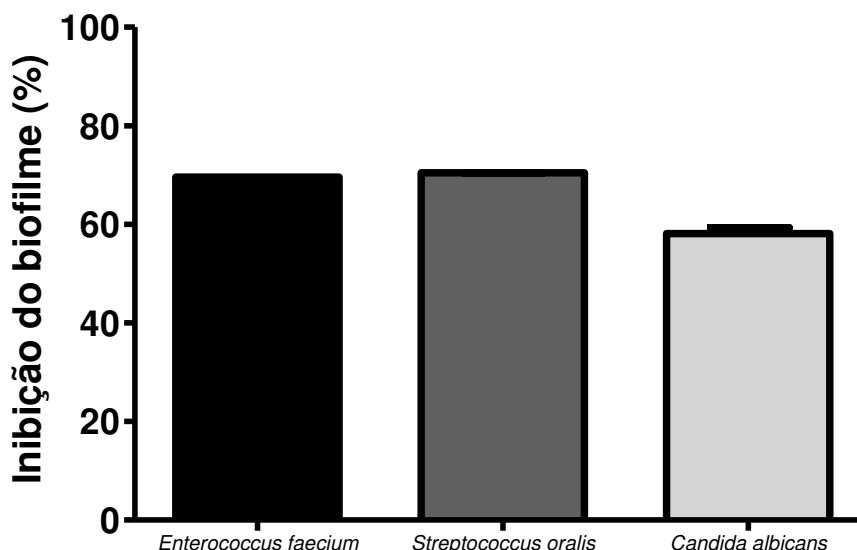
Em um estudo conduzido por Asadi *et al.*, (2023), o valor da concentração inibitória mínima de carvacrol contra *Escheria coli* foi de 125 µg/ml, apresentando atividade bactericida a partir de 250µg/ml, valores próximos aos obtidos neste trabalho. No estudo em questão, foi avaliada a composição do biofilme mediante metodologia de microscopia eletrônica de varredura, onde foi realizada avaliação da

expressão de dois genes relacionados a *quorum-sensing* e integridade celular, que constatarem eficácia antibiofilme considerável do carvacrol.

Ben Arfa *et al.*, (2006) investigaram as propriedades antibacterianas de dois compostos derivados do carvacrol em relação a diversas bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras, incluindo *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. aureus*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados desse estudo, em contraste com outro conduzido por Asadi *et al.*, (2023), indicaram que o carvacrol e seus derivados possuem propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de bactérias e fungos.

A maioria das investigações sobre o mecanismo de ação do carvacrol revela que seu principal alvo é a membrana citoplasmática bacteriana (Magi *et al.*, 2015). Sugere-se que o carvacrol pode penetrar a estrutura da membrana celular e causar a destruição da membrana externa das células microbianas (Abdollahzadeh *et al.*, 2014). Esse dano à membrana interfere na homeostase do pH e no equilíbrio dos íons inorgânicos, o que resulta na atividade antibacteriana do carvacrol.

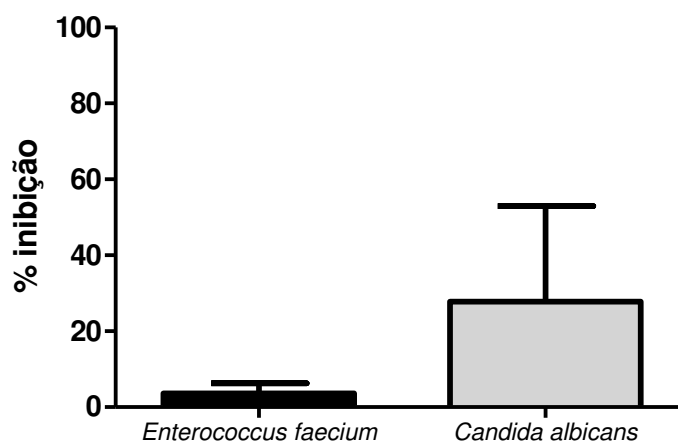
**Figura 23: Efeito do carvacrol sobre biofilme na etapa de proliferação**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: Biofilmes tratados com carvacrol foram avaliados de acordo com a porcentagem de inibição. Gráfico da porcentagem de inibição da proliferação. Constatou-se diferença estatisticamente significativa em relação aos microrganismos *E. faecium* e *C. albicans*. (ANOVA seguido de Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Os testes foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP.

**Figura 24: Efeito do carvacrol sobre biofilme na etapa de adesão**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: Biofilmes tratados com carvacrol isolado foram avaliados de acordo com a porcentagem de inibição. Gráfico da porcentagem de inibição da adesão. Foi constatada diferença estatisticamente significativa em relação aos microrganismos. (Teste t pareado,  $P > 0,05$ ). Os testes foram realizados em triplicata e os dados representam a média  $\pm$  DP

## 5.2 DESENVOLVIMENTO DO GEL DE QUITOSANA CONTENDO CARVACROL

A formulação farmacêutica é o processo de várias etapas que envolve a mistura do medicamento ativo com todos os outros componentes, levando em conta os fatores de tamanho de partícula, polimorfismo, pH e solubilidade, tornando-o o produto medical benéfico final. O produto farmacêutico comercializado para uso com uma mistura específica de ingredientes ativos e componentes inativos é conhecido como forma de dosagem. Ele precisa ser distribuído em uma dosagem específica e ter uma configuração específica, tais como invólucro de cápsula, gel e filmes (Afrin *et al.*, 2023).

A quitosana é um polímero biodegradável aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações biomédicas e farmacêuticas, possuindo propriedades antimicrobianas naturais e podendo ser combinada com outros agentes para amplificar sua eficácia (Saeed *et al.*, 2018). Dentre suas formas possíveis de administração, podem-se destacar filmes poliméricos e hidrogéis que se conjugam com demais substâncias incorporados (Huang *et al.*, 2017).

Em contraste com a possibilidade de administração desta substância como veículo, a quitosana apresenta propriedades antibacterianas e antioxidantes (El-Hack *et al.*, 2020), atuando também como quelante seletivo para íons como ferro, cobre, cádmio ou magnésio, entre outros, abrindo portas para uma variedade de outras aplicações (Ahmed *et al.*, 2016; Ardial *et al.*, 2017; Muxika *et al.*, 2017).

Estudos anteriores avaliaram a aplicabilidade da quitosana na terapia endodôntica com resultados promissores, especialmente como aprimorador de atividade antimicrobiana de selantes endodônticos (Da Silva *et al.*, 2013), carreadora de antibiótica no contexto da endodontia regenerativa (Soares *et al.*, 2018), irrigação do sistema de canais radiculares (Balsaraf *et al.*, 2023) e medicação intracanal (Thienngern *et al.*, 2022).

Neste sentido, reconhecendo suas propriedades benéficas no âmbito da endodontia através de resultados obtidos por estudos previamente conduzidos, neste estudo foi realizada a incorporação do carvacrol à quitosana de baixo peso molecular no intuito de obter-se um excipiente semissólido do tipo gel com ambas as substâncias agregadas.

Inicialmente foram pesadas alíquotas de carvacrol correspondentes a 0,1%, 0,5% e 1% de géis teste com volume total final de 10ml, para então ser conduzido o ensaio de estabilidade prévia com objetivo de definir qual solvente orgânico predisporia maior estabilidade à formulação após os ensaios. Os solventes a serem testados foram o DMSO e Tween 80, nas concentrações de 10% e 20% para DMSO e 0,5% e 1% para o Tween, sendo os mesmos incorporados às formulações com o carvacrol incorporado e 1% de quitosana. O pH do carvacrol e da formulação foi obtido através de fitas dosadoras de pH, onde foi constatado pH entre 4 e 5 para o carvacrol isolado e entre 5 e 6 para a formulação com o mesmo incorporado, independente do solvente e concentração utilizada.

Após a realização da centrifugação a 3000rpm por 30 minutos dos 4 géis com diferentes solventes em variadas concentrações, como sugerido no guia de cosméticos (Anvisa, 2024), verificou-se formação de corpo de fundo nos tubos contendo Tween em todas as proporções e DMSO a 10%, optando então pela utilização do DMSO na proporção de 20% como solvente de eleição para as formulações padrão.

Em acordo com os ensaios prévios aos testes de bioatividade dispostos no guia de estabilidade cosméticos (Anvisa, 2024), após a confecção dos géis a serem utilizados nos ensaios subsequentes, alíquotas de 2ml dos mesmos foram adicionadas a tubos transparentes com tampa e deixados pelo intervalo de 7 dias em condições de baixa ( $5 \pm 2$  °C), média ( $25 \pm 2$  °C) e alta ( $40 \pm 2$  °C) temperatura. Passados os 7 dias, foi avaliada a formação parcial de fases nos géis expostos a altas

e médias temperaturas em todas as concentrações, mantendo-se mais estável quando mantido em temperaturas baixas.

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) foi utilizada para caracterizar os géis, com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes na formulação e verificar interações intermoleculares entre os componentes, como o carvacrol e a quitosana. Cada grupo funcional absorve energia em frequências específicas no infravermelho, e possíveis interações podem ser evidenciadas por alterações na intensidade ou no deslocamento das bandas (Baidurah *et al.*, 2022).

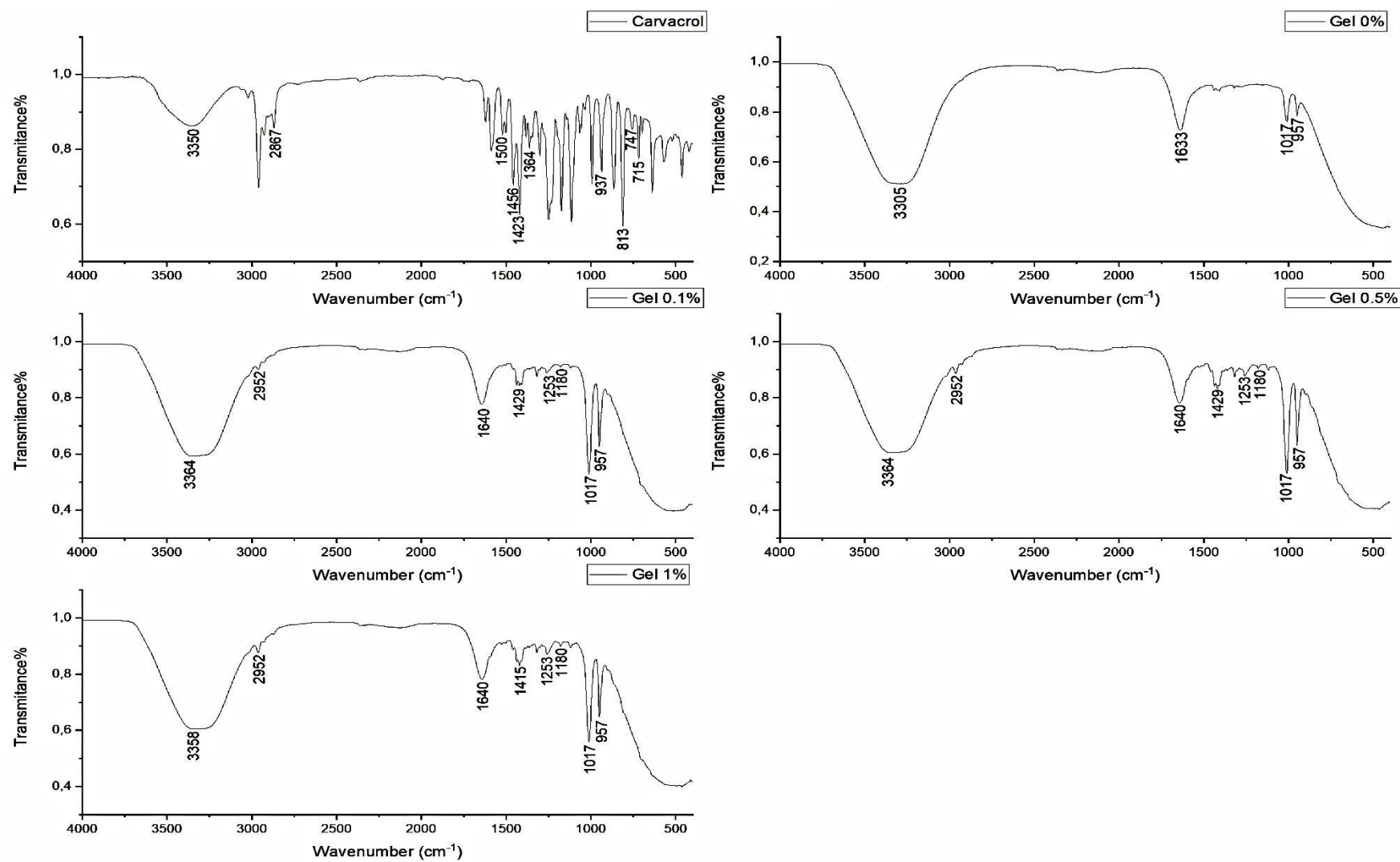
No Carvacrol isolado, foram identificadas faixas de absorção correspondentes às vibrações dos grupamentos hidroxila livres, com bandas entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , além de bandas em 2867  $\text{cm}^{-1}$ , associado às vibrações de alongamento  $\nu[\text{C-H}]$  (Uncu *et al.*, 2019; Valasi *et al.*, 2021). As vibrações das ligações C-C em anéis aromáticos foram observadas entre 1650 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizando alquílias (Zheng *et al.*, 2022). As vibrações de alongamento  $\nu[\text{C-H}]$  dos grupos terminais metil ( $-\text{CH}_3$ ) mostraram-se menos intensas que as dos grupos metileno ( $-\text{CH}_2$ ), com picos em 1456, 1423 e 1364  $\text{cm}^{-1}$ , confirmando a presença de metabólitos secundários, como monoterpenos (Valasi *et al.*, 2021). As bandas em 937 e 813  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídos a ligações C-OH fenólicas (Kim *et al.*, 2023), enquanto as vibrações em 747 e 715  $\text{cm}^{-1}$  estavam relacionadas ao alongamento  $\nu[\text{C=C}]$  aromático e aos grupamentos metileno (Nandiyanto *et al.*, 2023).

No gel 0% de quitosana, as faixas de absorção características da quitosana foram identificadas, com destaque para a região entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde às vibrações dos grupamentos hidroxila livres e das ligações N-H da estrutura principal (Ma *et al.*, 2019). Bandas próximas a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , associados à amida I (estiramento de  $\text{C=O}$ ), e picos em 1017  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes ao estiramento de C-O, também foram observados (Brás *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2019).

Comparando-se o espectro do gel 0% com géis contendo carvacrol (0,1%, 0,5% e 1%), notou-se que as vibrações dos grupamentos hidroxila livres e das ligações N-H eram mais intensas no gel 0%, sugerindo que as interações entre a quitosana e o carvacrol resultaram em um menor estiramento das bandas correspondentes (Figura 25). Esse comportamento foi similar ao observado por Loyola-Rodriguez *et al.* (2021) em um filme de quitosana-amido com extrato natural de orégano.

Além disso, bandas que não estavam presentes no gel 0% ou apresentavam estiramento reduzido entre 1640 e 1017  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes às vibrações das amidas secundárias (N-H) e terciárias (C-N), passaram a apresentar maior estiramento à medida que a concentração de carvacrol aumentava. Essas bandas, também presentes no espectro do carvacrol isolado, sugerem uma interação química entre o biopolímero e o carvacrol (Ma *et al.*, 2019; Brás *et al.*, 2020).

Figura 25: espectros de infravermelho de carvacrol e gel 0%, gel 0,5% e gel 1%



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Com o intuito de avaliar a capacidade das formulações em inibir o crescimento microbiano em meio sólido, foi realizado o teste de difusão em disco utilizando-se as bactérias *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. oralis* e o fungo *C. albicans* resistente a antifúngicos convencionais. Como controles positivos, foram utilizadas alíquotas de amoxicilina em suas respectivas concentrações inibitórias mínima para bactérias, e de nistatina, da mesma forma, para o fungo. A amoxicilina é um antibacteriano de amplo espectro da classe das aminopenicilinas prescrito previamente ao tratamento endodôntico como auxiliar no controle microbiano sistêmico em condições de abscesso apical agudo e infecções persistentes para pacientes com comprometimento sistêmico (Segura-egua *et al.*, 2017). Já a nistatina é um antifúngico poliênico cujo mecanismo de ação se dá pela ligação ao ergosterol, esteroide presente na membrana celular de fungos patogênicos como a *Candida sp* (Carmo *et al.*, 2023).

Para *E. faecium*, a amoxicilina promoveu a formação de um halo médio de 26mm, halo este que não foi evidenciado para a quitosana gel branco, carvacrol isolado ou gel incorporado com 0,1% de carvacrol. Todavia, o gel contendo carvacrol 0,5% e 1% predispueram a formação de halos de 20mm e 23mm, respectivamente, sendo consideradas diferença estatisticamente significativa sutil.

Nas placas contendo *E. faecalis*, foi possível verificar halo de inibição médio de 25mm quando tratados com amoxicilina, não havendo esta formação quando tratados com carvacrol isolado ou quitosana gel branco. Entretanto, para os géis de quitosana incorporados com 0,1%, 0,5% e 1% de carvacrol, houve a formação de halo inibitório, sem diferença estatisticamente significativa para os géis a 0,5% e 1% em relação ao controle positivo (sugerindo halos inibitórios com tamanhos próximos).

Nas placas contendo *S. oralis*, a amoxicilina promoveu formação de halo com diâmetro médio de 3,1cm, não sendo constatada esta formação para carvacrol isolado ou quitosana gel branco. Em contraponto, os géis incorporados com 0,1%, 0,5% e 1% de carvacrol predispueram à formação de halo com diâmetro médio de 12mm, 16mm e 23mm, respectivamente.

As placas que continham *C. albicans* utilizaram a Nistatina como controle positivo, predispondo à formação de halo de inibição com diâmetro médio de 25mm mediante utilização de alíquotas desta substância, halos estes que também se formaram mediante uso do carvacrol isolado em sua concentração inibitória mínima para este fungo, formando halo com diâmetro médio de 8mm. O gel de quitosana branco não promoveu a inibição deste microrganismo, todavia, os géis que continham

carvacrol incorporado a 0,1%, 0,5% e 1% formaram diâmetros médios inibitórios de 8mm, 13mm e 16mm, respectivamente.

Ambos os antimicrobianos utilizados como controles positivos inibiram satisfatoriamente o crescimento dos microrganismos. Resultados semelhantes foram observados em um estudo de Hacıoglu *et al.*, (2018), onde a utilização de nistatina em sua concentração inibitória mínima levou à formação de halos consideráveis contra *C. albicans* resistentes do mesmo registro ATCC, bem como o estudo conduzido por Nalini Aswath *et al.*, (2022) onde espécies Gram+ e Gram- isoladas foram inibidas mediante uso de amoxicilina. A ausência de atividade antibacteriana de quitosana gel branco pode ser atribuída ao fato da quitosana se difundir muito lentamente pelo ágar, então apenas os microrganismos em contato direto com o filme são inibidos (Yuan *et al.*, 2016).

**Tabela 2: valores de halo de inibição dos controles e formulações para as linhagens de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans***

|                              | Halo de inibição (mm) |                    |                   |                    |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|                              | <i>E. faecium</i>     | <i>E. faecalis</i> | <i>S. oralis</i>  | <i>C. albicans</i> |
|                              | (ATCC®<br>6569™)      | (ATCC®<br>19433™)  | (ATCC®<br>10557™) | (ATCC®<br>10321™)  |
| <b>Amoxicilina/Nistatina</b> | 26 ± 1,8              | 25 ± 1,5           | 31 ± 2            | 25 ± 0             |
| <b>Carvacrol</b>             | -                     | -                  | -                 | 8 ± 1*             |
| <b>Gel Br</b>                | -                     | -                  | -                 | -                  |
| <b>Gel 0,1%</b>              | -                     | 9 ± 1*             | 12 ± 0*           | 8 ± 0,5*           |
| <b>Gel 0,5%</b>              | 20 ± 1*               | 22 ± 0             | 16 ± 3*           | 13 ± 0*            |
| <b>Gel 1%</b>                | 23 ± 1*               | 25 ± 0             | 23 ± 0*           | 16 ± 1,5*          |

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Legenda: os símbolos “±” representam variações superiores ou inferiores dos diâmetros em relação às médias. O símbolo “-” representa a não formação de halo inibitório; “\*” representa diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle positivo. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÃO

O estudo revela que o carvacrol demonstrou elevada citotoxicidade apenas na concentração mais alta testada *in vitro*. No que tange a sua concentração inibitória mínima, avaliou-se potencial antibacteriano bacteriostático ou bactericida, a variar do microrganismo, bem como efeito antifúngico fugistático no valor de CIM. Em constraste, carvacrol exibiu efeitos significativos na redução de biofilmes de proliferação de microrganismos, além de apresentar atividade antioxidante promissora, evidenciada pela redução significativa dos níveis de eROS e NO nos ensaios.

Além disso, sugere-se que o mecanismo de ação de carvacrol ocorre no envoltório celular dos microrganismos testados, tendo em vista que a análise da permeabilidade de membrana pelo teste de doseamento do extravasamento de nucleotídeos e proteínas demonstrou significativa liberação destes conteúdos ao meio extracelular, tendo seu efeito majoritariamente pronunciado a partir da segunda hora em contato com o produto. A curva de crescimento possibilitou inferir que seu efeito ocorre predominantemente sobre as etapas *lag* e *log* dos microrganismos, prolongando-as com considerável queda na densidade de microrganismos.

Por meio das análises da análise em FTIR após a confecção das formulações, foi possível identificar o estabelecimento de interações intermoleculares entre o biopolímero e carvacrol, sendo avaliada maior estabilidade formulacional com a utilização de dimetil sulfoxido a 20% em relação às demais substância e concentrações testadas.

A análise antimicrobiana pelo teste de difusão em ágar adaptado a alíquotas demonstrou formação de halos inibitórios a partir de sua menor concentração, elevando o diâmetro proporcionalmente à elevação da concentração de carvacrol no gel. O gel com maior concentração predispôs à formação de halos inibitórios com diâmetros próximos ao controle positivo.

Conclui-se que carvacrol possui multifuncionalidade promissora, indicando resultados relevantes e baixa citotoxicidade para aplicação potencial como medicamento intracanal na endodontia. O estudo ressalta a importância de futuras pesquisas, especialmente em animais e humanos, para uma compreensão mais abrangente de suas propriedades e eficácia clínica, visando desenvolver formulações eficazes para o tratamento endodôntico, uma área que frequentemente enfrenta desafios e altas taxas de insucesso frente a microbiota resistente.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2726–2744, dez. 2020.
- ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177–183, 2014.
- AFRIN, S.; GUPTA, V. **Pharmaceutical Formulation**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562239/>, 2023.
- AHANGARI, Z. et al. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Calcium Hydroxide and Photodynamic Therapy Against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in Teeth With Periapical Lesions; An *In Vivo* Study. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 72–78, 28 mar. 2017.
- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 41–50, 11 set. 2010.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. **Achiev. Life Sci.**, v. 10, p. 27–37, 2016.
- AKHLAQ, A. et al. Carvacrol-Fabricated Chitosan Nanoparticle Synergistic Potential with Topoisomerase Inhibitors on Breast and Cervical Cancer Cells. **ACS Omega**, v. 8, n. 35, p. 31826–31838, 25 ago. 2023a.
- AKHLAQ, A. et al. Synergistic antibacterial activity of carvacrol loaded chitosan nanoparticles with Topoisomerase inhibitors and genotoxicity evaluation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 9, p. 103765–103765, 1 set. 2023.
- ALFADDA, S. et al. Antibacterial effect and bioactivity of innovative and currently used intracanal medicaments in regenerative endodontics. **Journal of endodontics**, v. 47, n. 8, 2021.
- ALGHAMDI, F.; SHAKIR, M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. **Cureus**, 13 mar. 2020.

- ALI, L. *et al.* Molecular Mechanism of *Quorum-Sensing* in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 960, 3 maio 2017.
- ALMADI, E. M.; ALMOHAIMEDE, A. A. Natural products in endodontics. **Saudi Medical Journal**, v. 39, n. 2, p. 124–130, fev. 2018.
- ALVARENGA, E. M. *et al.* Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 129–140, 25 dez. 2016.
- ANTUNES, H. S. *et al.* Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 7, p. 1037–1042, jul. 2015.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view>Acesso em: 05 de Junho de 2024
- ARDILA, N.; DAIGLE, F.; HEUZEY, M.-C.; AJJI, A. Antibacterial activity of neat chitosan powder and flakes. **Molecules**, v. 22, p. 100–119, 2017.
- ARKOWITZ, R. A.; BASSILANA, M. Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth. **F1000Research**, v. 8, 2019.
- ARSHADI, M. *et al.* Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance Patterns of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Different Sources in Southwest Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 47, n. 2, p. 264–272, 1 fev. 2018.
- ARSLAN, H. *et al.* Effect of calcium hydroxide mixed with lidocaine hydrochloride on postoperative pain in teeth with irreversible pulpitis and symptomatic apical periodontitis: a preliminary randomized controlled prospective clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, 27 maio 2020.
- ASADI, S. *et al.* Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, 3 mar. 2023.
- AWONUGA, A. O.; CAMP, O. G.; ABU-SOUD, H. M. A review of nitric oxide and oxidative stress in typical ovulatory women and in the pathogenesis of ovulatory

dysfunction in PCOS. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 21, p. 111, 23 nov. 2023.

AZIZI, Z. *et al.* Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. **Avicenna J Phytomed**, v. 12, n. 4, p. 371–387, 6 jul. 2022.

AZUMA, K. *et al.* Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 104–142, 13 mar. 2015.

BABII, C.; BAHRIN, L.G.; NEAGU, A.N.; GOSTIN, I.; MIHASAN, M.; BIRSA, L.M.; STEFAN, M. Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 630–663, 2016.

BAGO, I. *et al.* Evaluation of filling material remnants after basic preparation, apical enlargement and final irrigation in retreatment of severely curved root canals in extracted teeth. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 7, p. 962–973, 9 abr. 2020.

BAIDURAH, S. Methods of Analyses for Biodegradable Polymers: A Review. **Polymers**, v. 14, n. 22, p. 4928, 1 jan. 2022.

BARBOSA-RIBEIRO, M. *et al.* Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1022–1028, 1 jul. 2016.

BASERI, M. *et al.* The effect of periapical lesion size on the success rate of different endodontic treatments: a systematic review and meta-analysis. **Evidence-Based Dentistry**, v. 24, n. 1, p. 43, 1 mar. 2023.

BEDIAN, L. *et al.* Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 837–846, 1 maio 2017.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLO, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149–154, 2006. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x.

- BERNAL-MERCADO, A. T. et al. Hydrophobic Chitosan Nanoparticles Loaded with Carvacrol against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 699, 21 jan. 2022.
- BERNARDI, A.; TEIXEIRA, C. S. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. **Quintessence International**. v. 46, n. 7, p. 575–582, 1 jul. 2015.
- BERNATCHEZ, S.F.; MENON, V.; STOFFEL, J.; WALTERS, S.A.H.; LINDROOS, W.E.; CROSSLAND, M.C.; SHAWLER, L.G.; CROSSLAND, S.P.; BOYKIN Jr, J.V. Nitric oxide levels in wound fluid may reflect the healing trajectory. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p.410-417, 2013.
- BHUVA, B.; IKRAM, O. Complications in Endodontics. **Primary Dental Journal**, v. 9, n. 4, p. 52–58, 23 nov. 2020.
- BISWAS, D.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Molecular mechanism of antimicrobial activity of chlorhexidine against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0224107, 29 out. 2019.
- BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1185–1194, jun. 2012.
- BOJANG, E. *et al.* Immune Sensing of *Candida albicans*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 119, 1 fev. 2021.
- BONEV, B.; HOOPER, J.; PARISOT, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1295–1301, 13 mar. 2008.
- BOUTSIOUKIS, C.; ARIAS-MOLIZ, M. T. Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. **International Endodontic Journal**, 6 abr. 2022.
- CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3877–3886, 28 mar. 2016.
- CAMILLERI, J. Sealers and Warm Gutta-percha Obturation Techniques. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 1, p. 72–78, jan. 2015.
- CAMPOS, L.M. *et al.* *Mitracarpus frigidus*: a promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Industrial Crop Products**, v. 123, p. 731-739, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.038>.

- CANDEIRO, G. T. DE M. *et al.* Penetration of bioceramic and epoxy-resin endodontic cements into lateral canals. **Brazilian Oral Research**, v. 33, 2019.
- CAPUANO, N. *et al.* Nanoparticles and Their Antibacterial Application in Endodontics. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, p. 1690, 1 dez. 2023.
- CARDOSO, F. G. DA R. *et al.* Correlation Between Volume of Root Canal, Cultivable Bacteria, Bacterial Complexes and Endotoxins in Primary Infection. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 2, p. 117–122, mar. 2019.
- CARMO, A. *et al.* Antifungals: From Pharmacokinetics to Clinical Practice. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 884, 1 maio 2023.
- CAVALCANTI, I. M. G. *et al.* Interkingdom cooperation between *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* and *Actinomyces oris* modulates early biofilm development on denture material. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, 1 abr. 2016.
- CAZÓN, P.; VELÁZQUEZ, G.; RAMIREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136–148, 2017.
- CECI, M. *et al.* Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 11, p. 1195–1203, 30 nov. 2015.
- CHANG, K. L. B.; TSAI, G.; LEE, J.; FU, W. R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 327–332, 1997.
- CHANG, S.H.; YI-YUNG, L.; GUAN-JAMES, W.; CHUNG-HSIUNG, H.; GUO J. T. Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. **Int J Biol Macromol**, v. 131, p. 167-175, 2019.
- CHÁVEZ DE PAZ, L. E. *et al.* Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 10, p. 916–925, 31 jul. 2015.
- CHEAH, W. Y.; SHOW, P.-L.; NG, I.-S.; LIN, G.-Y.; CHIU, C.-Y.; CHANG, Y.-K. Antibacterial activity of quaternized chitosan modified nanofiber membrane. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 126, p. 569–577, 2019.
- CHEN, L.; SUH, B. I. Cytotoxicity and biocompatibility of resin-free and resin-modified direct pulp capping materials: A state-of-the-art review. **Dental Materials Journal**, v. 36, n. 1, p. 1–7, 2017.
- CHEN, Y. *et al.* Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS

signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 90–100, 5 fev. 2017.

CHENG, Y.-A. *et al.* Influence of cyclic heating on physical property and biocompatibility of  $\alpha$ - and  $\beta$ -form gutta-percha. **Journal of the Formosan Medical Association** = Taiwan Yi Zhi, v. 113, n. 8, p. 498–505, 1 ago. 2014.

CHOI, M.-J. *et al.* A novel three-dimensionally printed model to assess biofilm removal by ultrasonically activated irrigation. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 10, p. 1871–1877, 1 out. 2021.

CHONG, K. K. L. *et al.* *Enterococcus faecalis* Modulates Immune Activation and Slows Healing During Wound Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 12, p. 1644–1654, 19 dez. 2017.

CHOO, S. W. *et al.* Transcriptomic Responses to Coaggregation between *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus oralis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 22, 28 out. 2021.

CLINICAL STANDARD LABORATORY INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Twenty. Eight Informational Supplement M07. **CLSI**, 2018.

CLINICAL STANDARD LABORATORY INSTITUTE. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Informational Supplement M61. **CLSI**, 2017.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standard-Tenth Edition**. Wayne: CLSI, 2009a. (CLSI document M02-A10).

COCOLAS, A. H. *et al.* Heterocyclic  $\beta$ -keto sulfide derivatives of carvacrol: Synthesis and copper (II) ion reducing capacity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 19, p. 126636, 1 out. 2019.

CONNERT, T.; WEIGER, R.; KRASTL, G. Present status and future directions – Guided endodontics. **International Endodontic Journal**, 4 fev. 2022.

COSAN, G. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Calcium Hydroxide Mixed with Two Different Essential Oils. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2635, 20 abr. 2022.

DA SILVA, L. *et al.* Biofilm Formation within the Interface of Bovine Root Dentin Treated with Conjugated Chitosan and Sealer Containing Chitosan Nanoparticles. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 2, p. 249–253, fev. 2013.

DAKIN, H. D. ON THE USE OF CERTAIN ANTISEPTIC SUBSTANCES IN THE TREATMENT OF INFECTED WOUNDS. **BMJ**, v. 2, n. 2852, p. 318–320, 28 ago. 1915.

DARCEY, J. *et al.* Modern endodontic principles part 4: irrigation. **Dental Update**, v. 43, n. 1, p. 20–33, 2 jan. 2016.

DE FARIAS, J. O.; DE FREITAS LIMA, S. M.; REZENDE, T. M. B. Physiopathology of nitric oxide in the oral environment and its biotechnological potential for new oral treatments: a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 12, p. 4197–4212, 1 dez. 2020.

DE GRANDI, R. *et al.* Modulation of opportunistic species *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella melaninogenica*, *Rothia dentocariosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pseudopneumoniae* by intranasal administration of *Streptococcus salivarius* 24SMBc and *Streptococcus oralis* 89a combination in healthy subjects. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 1 Suppl, p. 60–66, 1 mar. 2019.

DIOGENES, A. *et al.* Regenerative endodontics. **The Journal of the American Dental Association**, v. 147, n. 5, p. 372–380, maio 2016.

DU, X. *et al.* Molecular characterization of Rif<sup>r</sup> mutations in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Journal of Chemotherapy**, v. 26, n. 4, p. 217–221, 6 dez. 2013.

DUNCAN, H. F. Present status and future directions—Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. **International Endodontic Journal**, 3 fev. 2022.

DUNNILL, C.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J.; DRYDEN, M.; COOKE, J.; LEAPER, D.; GEORGOPOULOS, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, v. 14, n. 1, p.89-96, 2017.

DUQUE, T. M. *et al.* Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 1, p. 53–63, 23 mar. 2018.

- ENAYATI, M. *et al.* Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 339–345, 18 set. 2015.
- ESCOBAR, Patrícia Maria *et al.* Influence of bioceramic intracanal medication on the bond strength of bioceramic root canal sealer. **Brazilian Oral Research**, v. 37, p. e056, 2023.
- ESTRELA, C. *et al.* Characterization of Successful Root Canal Treatment. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 1, p. 3–11, jan. 2014.
- ESTRELA, C. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://www.forp.usp.br/restauradora/Teses/estrela/estrela\\_id/estrela\\_id.pdf](https://www.forp.usp.br/restauradora/Teses/estrela/estrela_id/estrela_id.pdf)>. Acesso em: 23 maio. 2023.
- EZZ-ELDIN, Y. M.; ABOSEIF, A. A.; KHALAF, M. M. Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. **Life Sciences**, v. 242, p. 117222, fev. 2020.
- FARGES, J.-C. *et al.* Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–16, 2015.
- FERRER, M. D. *et al.* Evaluation of Clinical, Biochemical and Microbiological Markers Related to Dental Caries. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 11, p. 6049, 4 jun. 2021.
- FOERSTER, S. *et al.* Timekill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC Microbiology**, v.16, n.216, 2016.
- FOUAD, A. F. *et al.* Microbiome Changes during Regenerative Endodontic Treatment Using Different Methods of Disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 48, n. 10, p. 1273–1284, 1 out. 2022.
- FRIEDMAN, M. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7652–7670, 24 jul. 2014.
- GALLER, K. M. *et al.* Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1480, 2 fev. 2021.

- GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 20 mar. 2019.
- GERDES, K.; SEMSEY, S. Pumping persists. **Nature**, v. 534, n. 7605, p. 41–42, 25 maio 2016.
- GHATTARGI, V. C. *et al.* Genomic and physiological analyses of an indigenous strain, *Enterococcus faecium* 17OM39. **Functional & Integrative Genomics**, v. 18, n. 4, p. 385–399, 19 mar. 2018.
- GIOVANETTI, E. *et al.* Transduction of the *Streptococcus pyogenes* bacteriophage  $\phi$ m46.1, carrying resistance genes *mef(A)* and *tet(O)*, to other *Streptococcus* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 8 jan. 2015.
- Glossary Contemporary Terminology for Endodontics, AAE 2020)
- GÖK, S. M. *et al.* Klinik Örneklerden İzole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* İzolatlarının Antibiyotik Direnci ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 54, n. 1, p. 26–39, 15 jan. 2020.
- GONÇALVES, L. S. *et al.* The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 4, p. 527–532, abr. 2016.
- GUERREIRO-TANOMARU, J. M. *et al.* Effect of Zirconium Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Physicochemical Properties and Antibiofilm Activity of a Calcium Silicate-Based Material. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.
- GUIMARÃES, A. G. *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, dez. 2010.
- GUO, H. *et al.* Morphology of bacterial flora in root canals associated with apical abscesses. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 18, p. 3254–3258, 2014.
- GUZMAN PRIETO, A. M. *et al.* Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? **Frontiers in Microbiology**, 26:7:788. doi: 10.3389/fmicb.2016.00788. eCollection 2016 v. 7, 26 maio 2016.
- HACIOGLU, M. *et al.* Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an in vitro study. **PeerJ**, v. 5, p. e3467, 26 jul. 2017.

- HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 25 mar. 2017.
- HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40–50, fev. 2016.
- HE, G. *et al.* Antimicrobial susceptibility and minimum inhibitory concentration distribution of common clinically relevant non-tuberculous mycobacterial isolates from the respiratory tract. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 2499–2509, 18 set. 2022.
- HE, Z. *et al.* Effect of the *quorum-sensing* luxS gene on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **European Journal of Oral Sciences**, v. 124, n. 3, p. 234–240, 15 abr. 2016.
- HOSSEIN SALMANI *et al.* Carvacrol attenuated neuroinflammation, oxidative stress and depression and anxiety like behaviors in lipopolysaccharide-challenged rats. **Avicenna J Phytomed.** v. 12, n. 5, p. 514–526, 18 out. 2022.
- HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 85, p. 467–475, 2016.
- HU, T.; LEI, L.; ZHOU, X. D. [Research progress in pathogenesis and control of *Enterococcus faecalis* with persistent infection in root canals]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi = **Chinese Journal of Stomatology**, v. 57, n. 1, p. 10–15, 9 jan. 2022.
- HUANG, G.; LIU, Y.; CHEN, L. Chitosan and its derivatives as vehicles for drug delivery. **Drug Delivery**, v. 24, n. 2, p. 108–113, nov. 2017.
- IBRAHIM, Ahmed Mohamed; ZAKHARY, Siza Yacoub; AMIN, Suzan Abdul Wanees. Calcium hydroxide intracanal medication effects on pain and flare-up: a systematic review and meta-analysis. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 45, n. 3, 2020.
- IMRAN, M. *et al.* Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. **Food Science & Nutrition**, v. 10, n. 11, p. 3544–3561, 3 ago. 2022.
- INGLE, J. I.; BAKLAND, L. K.; BAUMGARTNER, J. C. **Endodontia**. 6. ed. Bloomington, IN: BC Decker, 2008. 996 p.

ISMAIL, M. *et al.* Carvacrol modulates the expression and activity of antioxidant enzymes in *Candida auris*. **Research in microbiology**, v. 173, n. 3, p. 103916, 2022.

JAFRI, H.; AHMAD, I. Thymus vulgaris essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de mycologie medicale**, v. 30, n. 1, p. 100911, 2020.

JANSEN, A.; SCHOLZ, C. F. P.; KILIAN, M. Re-evaluation of the taxonomy of the *Mitis* group of the genus *Streptococcus* based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of *Streptococcus dentisani* as *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* comb. nov., *Streptococcus tigurinus* as *Streptococcus oralis* subsp. *tigurinus* comb. nov., and *Streptococcus oligofermentans* as a later synonym of *Streptococcus cristatus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4803–4820, 1 nov. 2016.

JEONG, S. *et al.* Propionate, together with triple antibiotics, inhibits the growth of Enterococci. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 57, n. 11, p. 1019–1024, 1 nov. 2019.

KALANTAR MOTAMEDI, M. R. *et al.* Micro-CT Evaluation of Four Root Canal Obturation Techniques. **Scanning**, v. 2021, p. 1–7, 25 fev. 2021.

KALDALU, N.; HAURYLIUK, V.; TENSON, T. Persisters—as elusive as ever. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6545–6553, 4 jun. 2016.

KAO, P. H. N.; KLINE, K. A. Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 2932–2945, jul. 2019.

KARAMIFAR, K. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. **European Endodontic Journal**, 2020.

KART, D.; KUŞTİMUR, A. S. Investigation of Gelatinase Gene Expression and Growth of *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates in Biofilm Models. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 356–361, 11 jul. 2019.

KELMENDI, T. *et al.* Comparison of Sealing Abilities Among Zinc Oxide Eugenol Root-Canal Filling Cement, Antibacterial Bioceramic Paste, and Epoxy Resin, using

*Enterococcus faecalis* as a Microbial Tracer. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 28, 1 jun. 2022.

KIM, D.; *et al.* Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 39, n. 4, p. 241, 2014.

KIM, H. *et al.* Effects of extracellular vesicles derived from oral bacteria on osteoclast differentiation and activation. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 20 ago. 2022.

KIM, M.-A.; ROSA, V.; MIN, K.-S. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, dez. 2020.

KIM, Y.-M. *et al.* Characterization of Bioactivity of Selective Molecules in Fruit Wines by FTIR and NMR Spectroscopies, Fluorescence and Docking Calculations. **Molecules**, v. 28, n. 16, p. 6036–6036, 12 ago. 2023.

KIRCHHOFF, A. L.; VIAPIANA, R.; RIBEIRO, R. G. Repercussões periapicais em dentes com necrose pulpar. **RGO.Revista Gaúcha de Odontologia** (Online), v. 61, p. 469–475, 1 dez. 2013.

KRAUSE, S. T. *et al.* The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in *Lamiaceae* proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 52, 20 dez. 2021.

KRAWCZYK, B. *et al.* The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1900, 7 set. 2021.

KUMAR, J. *et al.* Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. **Journal of international oral health : JIOH**, v. 7, n. 2, p. 42–5, 2015.

KUMAR, R. S. Comparative Efficacy of Different Irrigant Activation Techniques for Irrigant Delivery Up to the Working Length of Mature Permanent Teeth: A Systematic Review and Meta-Analysis. **European Endodontic Journal**, 2023.

KWAK, S. W. *et al.* Comparison of the effects from coronal pre-flaring and glide-path preparation on torque generation during root canal shaping procedure. **Australian Endodontic Journal**, 20 jul. 2021.

LACERDA, M. F. L. S. *et al.* Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 73, n. 3, p. 212–217, 1 set. 2016.

LAROUCHE, J.; SHEORAN, S.; MARUYAMA, K.; MARTINO, M.M. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 7, p. 209-231, 2018.

LECETA, I. *et al.* Bio-based films prepared with by-products and wastes: environmental assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 64, p. 218–227, fev. 2014.

LEONARDO, R. DE T.; LEONARDO, M. R. Aspectos atuais do tratamento da infecção endodôntica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgias Dentistas**, v. 66, n. 3, p. 174–181, 1 set. 2012.

LILLICRAP, A. *et al.* Environmental fate and effects of novel *quorum-sensing* inhibitors that can control biofilm formation. **Chemosphere**, v. 164, p. 52–58, dez. 2016.

LIM, S. J. *et al.* Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors. **Medical Mycology**, v. 59, n. 12, p. 1127–1144, 3 dez. 2021.

LIMA, M. L. S. O. *et al.* A QUÍMICA DOS SANEANTES EM TEMPOS DE COVID-19: VOCÊ SABE COMO ISSO FUNCIONA?. **Química Nova**, v. 43, n. 5, p. 668–678, maio 2020.

LIZARDI-MENDOZA, J.; MONAL, W. M. A.; VALENCIA, F. M. G. Chemical characteristics and functional properties of chitosan. In: BAUTISTA-BAÑOS, S.; ROMANAZZI, G.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. (Eds.). *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. Academic Press, Elsevier Inc., Cambridge, 2016, pp. 3–31.

LOK, B. *et al.* The assimilation of different carbon sources in *Candida albicans*: Fitness and pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 59, n. 2, p. 115–125, 17 set. 2020.

Lopes HP, Siqueira Jr (2015). Medicação Intracanal. In: Lopes HP e Siqueira JF Jr. *Endodontia Biológica e Técnica*. 4ª ed., Rio de Janeiro, **Elsevier**. 945-975.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. *et al.* Patologia Pulpar e Peri radicular. In: LOPES, Helio Pereira; SIQUEIRA JUNIOR, José Freitas. *Endodontia: biologia e*

técnica. Rio de Janeiro - RJ: Medsi: **Guanabara Koogan**. 964 p., il. ISBN 978-85-277-0953-8. p. 645-691, 2015.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 29 dez. 2021.

LOYOLA-RODRIGUEZ, J. P. *et al.* Prevention of infective endocarditis and bacterial resistance to antibiotics: A brief review. **Special Care in Dentistry**, v. 39, n. 6, p. 603–609, 28 ago. 2019.

LYUTA, V.; ZAITSEVA, J.; LOBAKOVA, E.; ZAGOSKINA, N.; KUZNETSOV, A.; KHMEL, I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 121(11). p. 1073-1081, 2013.

MAĆZKA, W. *et al.* Carvacrol—A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 824–824, 27 abr. 2023.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 3 mar. 2015.

MAJUMDAR, S.; PAL, S. Cross- species communication in bacterial world. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 2, p. 187–190, 20 fev. 2017.

MANGWANI, N.; KUMARI, S.; DAS, S. Bacterial biofilms and *quorum-sensing*: fidelity in bioremediation technology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 43–73, 20 jan. 2016.

MAQUERA-HUACHO, P. M. *et al.* *In vitro* antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. **Biofouling**, v. 34, n. 6, p. 699–709, 3 jul. 2018.

MARINELLI, L.; DI STEFANO, A.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 903–921, 16 abr. 2018.

MARTINS, A. F.; FACCHI, S. P.; FOLLMANN, H. D.; PEREIRA, A. G.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: a review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 11, p. 20800–20832, 2014.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 15 fev. 2013.

- MBA, I. E. *et al.* Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 99, p. 105256, abr. 2022.
- MECHMECHANI, S. *et al.* Microencapsulation of carvacrol as an efficient tool to fight *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLoS One**, v. 17, n. 7, p. e0270200, 1 jul. 2022.
- MEMON, Naveed Ahmed *et al.* Assessment of the interappointment pain by using two different intracanal medicaments. **Pakistan Oral & Dental Journal**, v. 33, n. 1, 2013.
- MOMENIJAVID, M. *et al.* Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 9 maio 2022.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOZAYENI, M. A. *et al.* Comparison of Antifungal Activity of 2% Chlorhexidine, Calcium Hydroxide, and Nanosilver gels against *Candida Albicans*. **Journal of dentistry (Tehran, Iran)**, v. 12, n. 2, p. 109–17, 2015.
- MUXIKA, A. *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358–1368, dez. 2017.
- NALINI ASWATH; JUDITH, MJ.; KESAVARAM PADMAVATHY. Microbiota of dental abscess and their susceptibility to empirical antibiotic therapy. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 13, n. 4, p. 369–369, 1 jan. 2022.
- NANDIYANTO, A.B.D. *et al.* Interpretation of Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR): A Practical Approach in the Polymer/Plastic Thermal Decomposition. **Indonesian Journal of Science & Technology**. v. 8, n. 1, p. 113-126, 01 abr. 2023.
- NEELAKANTAN, P. *et al.* Biofilms in Endodontics—Current Status and Future Directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 11 ago. 2017.
- NEGM, N. A. *et al.* Effectuality of chitosan biopolymer and its derivatives during antioxidant applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1342–1369, dez. 2020.

- NEGM, N. A.; HEFNI, H. H. H.; ABD-ELAAL, A. A.; BADR, E. A.; ABOU KANA, M. T. H. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 152, p. 681–702, 2020.
- NG, Y-L. *et al.* Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature -- Part 2. Influence of clinical factors. **International endodontic journal**, v. 41, n. 1, p. 6–31, 2008.
- NIIMI, M. *et al.* Inhibitor-Resistant Mutants Give Important Insights into *Candida albicans* ABC Transporter Cdr1 Substrate Specificity and Help Elucidate Efflux Pump Inhibition. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 1, 18 jan. 2022.
- NIU, C. *et al.* Carvacrol Induces *Candida albicans* Apoptosis Associated With Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin Pathway. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 30 abr. 2020.
- NÓBREGA, J. R. *et al.* Antifungal activity of carvacrol and antifungal agent combinations against non-*albicans Candida* species. **Scientia plena**, v. 15, n. 10, 2019.
- NOSTRO A.; ROCCARO A.S.; BISIGNANO G.; MARINO A.; CANNATELLI M.A.; PIZZIMENTTI F.C.; CIONI P.L.; PROCOPIO F.; BLANCO A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56. n.4, p. 519-523, 2007.
- OKAHASHI, N. *et al.* Oral *mitis* group streptococci: A silent majority in our oral cavity. **Microbiology and Immunology**, 4 out. 2022.
- OLIVEIRA, F. *et al.* Would carvacrol be a supporting treatment option effective in minimizing the deleterious effects of COVID-19? Naunyn-Schmiedeberg's **Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 12, p. 2471–2474, 20 out. 2021.
- OMKAR BALSARAF *et al.* Comparative evaluation of antifungal efficacy of conventional endodontic irrigants and chitosan nanoparticles. **PubMed**, v. 26, n. 2, p. 226–229, 19 maio 2023.
- OSTARECK, D. H.; OSTARECK-LEDERER, A. RNA-Binding Proteins in the Control of LPS-Induced Macrophage Response. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 4 fev. 2019.
- PAIKKATT, J. V. *et al.* A. Efficacy of various intracanal medicaments in human primary teeth with necrotic pulp against *Candida* biofilms: an *in vivo* study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 10, p. 45-48, 2017.

PANDEY, V. *et al.* Assessment of Correlation between Clinical Parameters and Pulp Canal Pathogens in Endodontic Pathologies: A Microbiological Study. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 17, n. 8, p. 654–658, 2016.

PAPADOPOULOU, E. *et al.* Adaptive laboratory evolution to hypersaline conditions of lactic acid bacteria isolated from seaweed. **New Biotechnology**, v. 75, p. 21–30, 25 jul. 2023.

PARK, H. S.; JUNG, H. Y.; PARK, E. Y.; KIM, J.; LEE, W. J.; BAE, Y. S. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, p. 3589-3593, 15 set. 2004.

PELVAN, E. *et al.* Immunomodulatory effects of selected medicinal herbs and their essential oils: A comprehensive review. **Journal of Functional Foods**, v. 94, p. 105108, jul. 2022.

PETRIDIS, X. *et al.* Chemical efficacy of several NaOCl concentrations on biofilms of different architecture: new insights on NaOCl working mechanisms. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 12, p. 1773–1788, 31 ago. 2019.

PHILIBERT, T.; LEE, B. H.; FABIEN, N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1314–1337, 27 out. 2016.

PIRANI, C.; CAMILLERI, J. Effectiveness of root canal filling materials and techniques for treatment of apical periodontitis: A systematic review. **International Endodontic Journal**, 5 jul. 2022.

PLOTINO, G.; GRANDE, N. M.; MERCADE, M. Photodynamic therapy in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 6, p. 760–774, 25 dez. 2018.

PRADA, I. *et al.* Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 24, n. 3, p. 364–72, 2019.

PREMETIS, G. E. *et al.* Structural and functional features of a broad-spectrum prophage-encoded enzybiotic from *Enterococcus faecium*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 8 maio 2023.

PROVENZANO, J. C. *et al.* Metaproteome Analysis of Endodontic Infections in Association with Different Clinical Conditions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76108, 15out. 2013.

- QIN, Y.; LI, P. Antimicrobial chitosan conjugates: current synthetic strategies and potential applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 2, p. 4, 2020.
- QU, C.; LI, Z.; WANG, X. UHPLC-HRMS-based untargeted lipidomics reveal mechanism of antifungal activity of carvacrol against *Aspergillus flavus*. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 1, p. 93, 2021.
- RANJITKAR, S. *et al.* Cytotoxic effects on cancerous and non-cancerous cells of trans-cinnamaldehyde, carvacrol, and eugenol. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 16281, 11 ago. 2021.
- RATIH, D. N. *et al.* Antibacterial and Cytotoxicity of Root Canal Sealer with the Addition of Chitosan Nanoparticle at Various Concentrations. **European Journal of Dentistry**, v. 17, n. 2, p. 398–402, 21 jun. 2022.
- RETSAS, A. *et al.* The Effect of the Ultrasonic Irrigant Activation Protocol on the Removal of a Dual-species Biofilm from Artificial Lateral Canals. **Journal of Endodontics**, v. 48, n. 6, p. 775–780, jun. 2022.
- RICUCCI, D. *et al.* Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. **Journal of Dentistry**, v. 86, p. 41–52, jul. 2019.
- RÔÇAS, I. N. *et al.* Effects of Calcium Hydroxide Paste in Different Vehicles on Bacterial Reduction during Treatment of Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 49, n. 1, p. 55–61, 1 jan. 2023.
- RZYCKI, M. *et al.* Unraveling the mechanism of octenidine and chlorhexidine on membranes: Does electrostatics matter? **Biophysical Journal**, v. 120, n. 16, p. 3392–3408, ago. 2021.
- SAATCHI, M. *et al.* Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, p. 356–365, 2014.
- SAEED, A.; HAIDER, A.; ZAHID, S.; KHAN, S.A.; FARYAL, R.; KALEEM, M. *In-vitro* antifungal efficacy of tissue conditioner-chitosan composites as potential treatment therapy for denture stomatitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 761–766, 2018.
- SAHARIAH, H. M. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives. In: KIM, S.-K. (Ed.). *Marine Glycobiology: Principles and Applications*. **CRC Press**, pp. 345–369, 2017.

- SAKKO, M.; TJÄDERHANE, L.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R. Microbiology of Root Canal Infections. **Primary Dental Journal**, v. 5, n. 2, p. 84–89, maio 2016.
- SALAZAR, J. K. *et al.* Desiccation survival in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* related to initial cell concentration and cellular components. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 3, p. 398-405, 2 dez. 2021.
- SALEHI, B. *et al.* Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1688–1706, 22 maio 2018.
- SAMAH MECHMECHANI *et al.* Pepsin and Trypsin Treatment Combined with Carvacrol: An Efficient Strategy to Fight *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* Biofilms. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 143–143, 6 jan. 2023.
- SAMPAIO, L. A. *et al.* Antitumor Effects of Carvacrol and Thymol: A Systematic Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 7 jul. 2021.
- SANTANA, D. *et al.* ARTIGO DE REVISÃO Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans* New approaches on virulence factors of *Candida albicans*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: [https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/23079/1/15\\_v.12\\_2.pdf](https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/23079/1/15_v.12_2.pdf), 2013.
- SANTOS-SÁNCHEZ, N.F.; SALAS-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. **Antioxidants**, v. 10, p.1-29, 2019.
- SCHROEDER, M.; BROOKS, B.; BROOKS, A. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. **Genes**, v. 8, n. 1, p. 39, 18 jan. 2017.
- SEDGLEY, C. M. *et al.* Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 1, p. 10–19, fev. 2005.
- SEGURA-EGEA, J. J. *et al.* Antibiotics in Endodontics: a review. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 12, p. 1169–1184, 16 jan. 2017.
- SETZER, F. C.; LEE, S.-M. Radiology in Endodontics. **Dental Clinics of North America**, v. 65, n. 3, p. 475–486, jul. 2021.
- SHABBIR, J. *et al.* Access Cavity Preparations: Classification and Literature Review of Traditional and Minimally Invasive Endodontic Access Cavity Designs. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 8, p. 1229–1244, 1 ago. 2021.
- SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 10, p. 1417–1426, out. 2016.

SIMÕES, M. *et al.* Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. **Biofouling**, v. 24, n. 5, p. 339–349, 4 jul. 2008.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES, H. P.; ELIAS, Carlos Nelson. Obturação do sistema de canais radiculares. In: LOPES, Helio Pereira; SIQUEIRA JUNIOR, José Freitas. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro - RJ: Medsi: **Guanabara Koogan**. 964 p., il. ISBN 978-85-277-0953-8. p. 645-691, 2015.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F. *et al.* Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. suppl 1, 18 out. 2018.

SOARES, D. G. *et al.* Biological Analysis of Simvastatin-releasing Chitosan Scaffold as a Cell-free System for Pulp-dentin Regeneration. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 6, p. 971-976.e1, 1 jun. 2018.

SOMASUNDARAM, S.; SUBRAMANYAM, D. Clinical and Radiographic Evaluation of Aloe vera vs Formocresol as a Pulpotomy Medicament in Primary Molars: A Double Blinded Randomized Controlled Trial. International **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 138–143, 2020.

SOMENSI, N. *et al.* Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-kB pathway. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105743, out. 2019.

SPENCER, ALR, SPENCER, JFT. Public Health Microbiology: Methods and Protocols, 1st ed. Human Press Inc., New Jersey, 2004.

STÁJER, A. *et al.* Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. **Dentistry Journal**, v. 8, n. 2, p. 43, 7 maio 2020.

STROPPIA, P.H.F.; ANTINARELLI, L.M.R.; CARMO, A.M.L.; GAMEIRO, J.; COIMBA, E.S.; DA SILVA, A.D. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonenses*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.

STUART, C.H., SCHWARTZ, S.A., BEESON, T.J., OWATZ, C.B. 2006. Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J. Endod.** 32, 93–98.

SUBRAMANYAM, D.; SOMASUNDARAM, S. Clinical and radiographic outcome of herbal medicine versus standard pulpotomy medicaments in primary molars: a

systematic review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 10, p. ZE12–ZE16, 2017.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. ‘Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay’. **Sensors**, n. v. 3, n. 8, p. 276-284, 2003.

SUN, M.-Y. *et al.* Chromosome-level assembly and analysis of the Thymus genome provide insights into glandular secretory trichome formation and monoterpene biosynthesis in thyme. **Plant communications**, v. 3, n. 6, p. 100413–100413, 1 jul. 2022.

SUN, X. *et al.* Microbial Communities in the Extraradicular and Intraradicular Infections Associated With Persistent Apical Periodontitis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 12 jan. 2022.

SY, K. *et al.* How Adding Chlorhexidine or Metallic Nanoparticles Affects the Antimicrobial Performance of Calcium Hydroxide Paste as an Intracanal Medication: An *In Vitro* Study. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1352–1352, 5 nov. 2021.

TABASSUM, S.; KHAN, F. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **European Journal of Dentistry**, v. 10, n. 1, p. 144, 2016.

TAWAKOLI, P. N. *et al.* Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 2, p. 153–160, 19 jan. 2016.

THIENNGERN, P. *et al.* Efficacy of chitosan paste as intracanal medication against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm compared with calcium hydroxide in an in vitro root canal infection model. **BMC Oral Health**, v. 22, n. 1, 16 ago. 2022.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S. *et al.* The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 5, p. 712–735, 22 jan. 2021.

TIEN, B. Y. Q. *et al.* *Enterococcus faecalis* Promotes Innate Immune Suppression and Polymicrobial Catheter-Associated Urinary Tract Infection. **Infection and immunity**, v. 85, n. 12, p. e00378-17, 2017.

TOHIDI, B. *et al.* Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different Thymus species. **Phytochemistry**, v. 169, p. 112126, jan. 2020.

UNCU, O. *et al.* Use of FTIR and UV–visible spectroscopy in determination of chemical characteristics of olive oils. **Talanta**, 201, 65–73.

UPADYA, M.; SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Role of Efflux Pump Inhibitors on the Antibiofilm Efficacy of Calcium Hydroxide, Chitosan Nanoparticles, and Light-activated Disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1422–1426, out. 2011.

URBAN, K. *et al.* Canal cleanliness using different irrigation activation systems: a SEM evaluation. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 9, p. 2681–2687, 9 fev. 2017.

VALASI, Lydia; KOKOTOU, Maroula G.; PAPPAS, Christos S. GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of Pistacia vera (Greek variety “Aegina”) oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality. **Food Research International**, v. 148, p. 110590, 2021.

VAN DER PLOEG, J. R. Genome sequence of the temperate bacteriophage PH10 from *Streptococcus oralis*. **Virus Genes**, v. 41, n. 3, p. 450–458, 28 ago. 2010.

VAN TYNE, D.; MARTIN, M.; GILMORE, M. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. **Toxins**, v. 5, n. 5, p. 895–911, 29 abr. 2013.

VENSKUTONIS, T. *et al.* Periapical and Endodontic Status Scale Based on Periapical Bone Lesions and Endodontic Treatment Quality Evaluation Using Cone-beam Computed Tomography. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 2, p. 190–196, fev. 2015.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydr. Polym.**, v. 164, p. 268–283, 2017.

VIRDEE, S. *et al.* The influence of irrigant activation, concentration and contact time on sodium hypochlorite penetration into root dentine: an ex vivo experiment. **International Endodontic Journal**, 12 mar. 2020.

WEI, Y.; STURGES, C. I.; PALMER, K. L. Human Serum Supplementation Promotes *Streptococcus mitis* Growth and Induces Specific Transcriptomic Responses. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, p. e0512922, 15 jun. 2023.

WITCHLEY, J. N. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 3, p. 432-443.e6, 13 mar. 2019.

WU, D. T. *et al.* Polymeric Scaffolds for Dental, Oral, and Craniofacial Regenerative Medicine. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 7043, 22 nov. 2021.

XIE, Z. *et al.* Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8991, 20 ago. 2021.

YAN, Y. *et al.* Potential apply of hydrogel-carried chlorhexidine and metronidazole in root canal disinfection. **Dental Materials Journal**, v. 40, n. 4, p. 986–993, 25 jul. 2021.

YILDIRIM, A.; LÜBBERS, H.-T.; YILDIRIM, V. [Endodontic filling with gutta-percha-requirements, formation and characteristics]. **Swiss Dental Journal**, v. 126, n. 2, p. 150–151, 2016.

YOO, Y.-J. *et al.* Candida albicans Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1300, 26 ago. 2020.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources: Structure, properties and applications. **Mar. Drugs**, v. 13, p. 1133–1174, 2015.

YUAN, G.; XIAOE, C.; DUO, L. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Res Int**, v. 89, p. 117-128, 2016.

YUMOTO, H. *et al.* The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 3, p. 105–117, ago. 2018.

ZANCAN, R. F. *et al.* Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. **Journal of Endodontics**, v. 42, p. 1822-1828, 2016.

ZANCAN, R. F. *et al.* Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. **Microscopy Research and Technique**, v. 82, n. 5, p. 494–500, 29 dez. 2018.

ZANDI, H. *et al.* Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 3, p. 372–378, mar. 2018.

ZHENG, H. *et al.* Fabrication, Characterization, and Antimicrobial Activity of Carvacrol-Loaded Zein Nanoparticles Using the pH-Driven Method. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9227–9227, 17 ago. 2022.