UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
***CAMPUS* AVANÇADO GOVERNADOR VALADARES**
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

Caio Augusto Freitas Martins

Potencial terapêutico do extrato metanólico de casca de açaí no controle antimicrobiano de *Enterococcus faecalis*

Governador Valadares
2026

Caio Augusto Freitas Martins

Potencial terapêutico do extrato metanólico de casca de açaí no controle antimicrobiano de *Enterococcus faecalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde, área de concentração Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alessandro Pieri

Governador Valadares

2026

Ficha catalográfica com os dados fornecidos pelo autor.

Martins, Caio Augusto Freitas.
Potencial terapêutico do extrato metanólico de casca de açaí no controle antimicrobiano de *Enterococcus faecalis* / Caio Augusto Freitas Martins. – 2026.
54 p. : il.

Orientador: Fabio Alessandro Pieri.
Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida – ICV. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2026.

1. Endodontia. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. *Euterpe oleracea*. 4. Produtos naturais. 5. Modelo linear misto. I. Pieri, Fabio Alessandro, orient. II. Título.

Caio Augusto Freitas Martins

Potencial terapêutico do extrato metanólico de casca de açaí no controle antimicrobiano de Enterococcus faecalis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde. Área de concentração: Biociências.

Aprovado em 7 de agosto de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Alessandro Pieri - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Leandro de Morais de Cardoso
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Cristian Ferreira de Souza
Fundação Oswaldo Cruz

Juiz de Fora, 16/07/2026.

Documento assinado eletronicamente por **CRISTIAN FERREIRA DE SOUZA**, **Usuário Externo**, em 11/08/2026, às 13:42, 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 **Fabio Alessandro Pieri**, **Professor(a)**, em 05/11/2026, às 10:06, 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 **Leandro de Morais Cardoso**, **Diretor(a)**, em 11/11/2026, às 13:52, 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) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3089564** e o código CRC **311ADFFD**.

RESUMO

Infecções endodônticas persistentes associadas a *Enterococcus faecalis* motivam a investigação de produtos naturais com possível ação antimicrobiana. Este estudo avaliou, in vitro, o extrato metanólico do epicarpo (casca) de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) por microdiluição em caldo, acompanhamento da contagem bacteriana por 24 horas e ensaio de aderência com cristal violeta. Na cinética, foram descritas quatro repetições independentes por concentração, com três réplicas técnicas em seis tempos; os registros disponíveis foram avaliados por modelo linear misto com intercepto aleatório e estrutura autorregressiva de primeira ordem. A concentração foi tratada como fator, o tempo foi representado por termos linear e quadrático, e as comparações entre concentrações em cada tempo foram ajustadas pelo método de Holm. Não houve inibição visual nas concentrações testadas, estabelecendo-se CIM superior a 20 mg/mL. No modelo misto, o efeito global de concentração não foi significativo ($p = 0,9936$); os termos temporal linear e quadrático e o efeito de experimento foram significativos, enquanto as interações concentração por tempo permaneceram $p > 0,05$. As comparações ajustadas identificaram médias estimadas menores para 1 mg/mL em parte dos tempos nos tempos intermediários de 4 a 12 horas, sem diferenças entre concentrações em 0, 2 e 24 horas. Esse padrão foi pontual e não configurou resposta dose-dependente. No ensaio de cristal violeta, a ANOVA fatorial indicou efeitos de grupo, concentração e interação ($p < 0,0001$), confirmados em análise de sensibilidade com correção robusta HC3. Em 20 mg/mL, o grupo teste apresentou absorbância média 1,75 unidade acima do controle negativo. Entretanto, a não normalidade, a heterogeneidade das variâncias e, principalmente, a pigmentação e a precipitação do extrato impedem atribuir o aumento do sinal à aderência ou à biomassa bacteriana. Nas condições avaliadas, o extrato bruto não demonstrou efeito antimicrobiano em 24h dependente da concentração contra *E. faecalis*. Os resultados delimitam a atividade da fração testada e indicam a necessidade de ensaios com controles de interferência, outras frações do fruto e métodos independentes de quantificação da viabilidade bacteriana.

Palavras-chave: Endodontia. *Enterococcus faecalis*. *Euterpe oleracea*. Produtos naturais. Modelo linear misto.

ABSTRACT

Persistent endodontic infections associated with *Enterococcus faecalis* motivate the investigation of natural products with potential antimicrobial activity. This in vitro study evaluated methanolic açaí epicarp (fruit peel; *Euterpe oleracea* Mart.) extract using broth microdilution, 24-hour bacterial count monitoring, and a crystal violet adhesion assay. For the longitudinal assay, four independent experiments per concentration, three technical replicates and six time points were specified; available count data were evaluated with a linear mixed model containing a random intercept and first-order autoregressive structure. Concentration was treated as a factor, time was represented by linear and quadratic terms, and comparisons among concentrations at each time point were adjusted by Holm's method. No visual inhibition occurred at the tested concentrations, establishing an MIC greater than 20 mg/mL. In the mixed model, the overall concentration effect was not significant ($p = 0.9936$); the linear and quadratic time terms and the experiment effect were significant, whereas concentration-by-time interactions remained above 0.05. Adjusted comparisons identified lower estimated means for 1 mg/mL at some time points at the retained intermediate time points (4, 8, and 12 hours), with no differences among concentrations at 0, 2, and 24 hours. This isolated pattern did not constitute a dose-dependent response. In the crystal violet assay, factorial ANOVA indicated group, concentration, and interaction effects ($p < 0.0001$), which remained significant in an HC3 robust sensitivity analysis. At 20 mg/mL, mean absorbance in the test group was 1.75 units above the negative control. However, non-normality, variance heterogeneity, and especially extract pigmentation and precipitation precluded attribution of the increased signal to adhesion or bacterial biomass. Under the evaluated conditions, the crude extract did not demonstrate a concentration-dependent antimicrobial effect against *E. faecalis*. The results delimit the activity of the tested fraction and indicate the need for interference controls, other fruit fractions, and independent bacterial viability quantification methods.

Keywords: Endodontics. *Enterococcus faecalis*. *Euterpe oleracea*. Natural products. Linear mixed model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Resultado do ensaio de concentração inibitória mínima do extrato metanólico do epicarpo de açaí contra *Enterococcus faecalis*, avaliado por microdiluição em caldo com resazurina utilizando as concentrações 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL. 24

Figura 2 – Médias marginais estimadas da contagem de *Enterococcus faecalis* em concentrações representativas do extrato metanólico do epicarpo de açaí durante 24 horas, com intervalos de confiança de 95%. 27

Figura 3 – Distribuição das médias marginais estimadas da contagem de *Enterococcus faecalis* segundo a concentração do extrato metanólico do epicarpo de açaí e o tempo de incubação. 28

Figura 4 – Evolução da contagem média de *Enterococcus faecalis* durante 24 horas nas diferentes concentrações do extrato metanólico do epicarpo de açaí. 29

Figura 5 – Média do sinal de absorbância a 540 nm no ensaio de cristal violeta segundo o grupo experimental e a concentração do extrato metanólico do epicarpo de açaí, com intervalos de confiança de 95%. 31

Figura 6– Avaliação gráfica da normalidade, homogeneidade das variâncias e observações influentes na ANOVA fatorial aplicada ao sinal de absorbância do ensaio de cristal violeta. 32

Figura 7 – Aspecto macroscópico da placa após o ensaio de cristal violeta, evidenciando pigmentação e precipitação nas maiores concentrações do extrato metanólico do epicarpo de açaí. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 – Efeitos da concentração (20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL), do tempo, do experimento e das interações no modelo linear misto da contagem de *Enterococcus faecalis*, expressa em log10(UFC/mL + 1), durante 24 horas	25
Tabela 2 – Média e desvio-padrão da absorbância a 540 nm nos grupos teste, controle positivo com metanol e controle negativo, nas doze concentrações do extrato metanólico do epicarpo de açaí	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Significado
AR(1)	Estrutura autorregressiva de primeira ordem
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 OBJETIVOS 12
2.1 Objetivo geral 12
2.2 Objetivos específicos 12
3 REVISÃO DA LITERATURA 13
3.1 Resistência antimicrobiana 13
3.2 Infecções endodônticas 14
3.3 Extratos naturais amazônicos 15
3.4 Açaí 16
3.4.1 Atividade antimicrobiana de derivados de açaí 17
3.5 Lacunas na literatura e justificativa para a pesquisa 18
4 METODOLOGIA 19
4.1 Seleção do extrato natural amazônico 19
4.2 Preparação da linhagem bacteriana 19
4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) 19
4.4 Cinética bacteriana 20
4.5 Avaliação da aderência 20
4.6 Análise estatística 21
4.6.1 Análise longitudinal da contagem bacteriana 21
4.6.2 Análise do ensaio de aderência 21
4.7 Controle de qualidade e repetições 22
4.8 Uso de inteligência artificial na construção do trabalho 23
5 RESULTADOS 24
5.1 Concentração Inibitória Mínima 24
5.2 Cinética bacteriana 25
5.2.1 Modelo linear misto 25
5.2.2 Médias estimadas e comparações múltiplas 25
5.2.3 Controle positivo 26

SUMÁRIO

5.2.4 Síntese dos achados longitudinais 26

5.3 Ensaio de aderência 30

6 DISCUSSÃO 34

7 CONCLUSÃO 37

REFERÊNCIAS 38

APÊNDICE A – SUBMISSÃO À REVISTA E ARTIGO 41

1 INTRODUÇÃO

As infecções persistentes e os casos de retratamento continuam entre os principais desafios da Endodontia. *Enterococcus faecalis* é frequentemente identificado em infecções secundárias ou persistentes e apresenta mecanismos que favorecem sua permanência no sistema de canais radiculares (BARBOSA-RIBEIRO et al., 2024; LIMA, 2026).

A persistência de *E. faecalis* relaciona-se à tolerância à privação de nutrientes, à sobrevivência em ambiente alcalino, à penetração em túbulos dentinários e à capacidade de formar biofilme. Esses mecanismos foram sintetizados por Elashiry, Bergeron e Tay (2023) e ajudam a explicar a recuperação do microrganismo em canais previamente tratados.

O hipoclorito de sódio e a clorexidina permanecem importantes na desinfecção endodôntica, mas apresentam limitações próprias. O hipoclorito associa ação antimicrobiana à dissolução tecidual, porém pode causar dano quando extravasado; a clorexidina possui substantividade, mas não dissolve matéria orgânica. A persistência de biofilmes após o preparo químico-mecânico justifica a avaliação de agentes complementares, incluindo compostos naturais (GOMES et al., 2013; ZEHNDER, 2006; DAGLIA, 2012).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) contém antocianinas, flavonoides, procianidinas e outros compostos fenólicos associados a atividades antioxidante e antimicrobiana. A composição e a atividade variam conforme a parte do fruto, o solvente e o processamento, o que impede extrapolar resultados obtidos com polpa, sementes ou formulações fotoativadas para o extrato metanólico do epicarpo (YAMAGUCHI et al., 2015).

Penna Felisberto et al. (2025) avaliaram uma formulação de açaí como fotossensibilizador e observaram redução de *E. faecalis* e penetração em túbulos dentinários. Esse modelo, com formulação e possibilidade de fotoativação, não equivale ao extrato bruto do epicarpo avaliado no presente estudo e deve ser utilizado apenas como referência do potencial da espécie, não como prova de eficácia da mesma fração vegetal.

O aproveitamento do epicarpo, um subproduto do processamento do fruto, também possui interesse tecnológico e ambiental. Esse interesse, contudo, depende da demonstração experimental de atividade, estabilidade, composição química e segurança da preparação específica.

Assim, este estudo investigou a atividade do extrato metanólico do epicarpo de *E. oleracea* contra *E. faecalis*, delimitando sua CIM, o comportamento longitudinal das contagens e o sinal obtido no ensaio de aderência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar in vitro a atividade do extrato metanólico do epicarpo de açaí contra *Enterococcus faecalis*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do extrato contra *Enterococcus faecalis*;
- Descrever a variação longitudinal das contagens de *Enterococcus faecalis* durante 24 horas de exposição;
- Avaliar o sinal de absorbância no ensaio de aderência com cristal violeta e seus possíveis fatores de interferência;
- Delimitar a atividade da fração vegetal testada para orientar estudos posteriores;
- Comparar os achados com evidências sobre outras frações e formulações de *Euterpe oleracea*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana reduz a efetividade de tratamentos infecciosos e constitui problema relevante para a saúde pública. Na Odontologia, o uso inadequado de antibióticos sistêmicos aumenta a pressão seletiva e reforça a necessidade de prescrição baseada em indicação clínica (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, [s. d.]; CIEPLIK, 2025).

Nas infecções endodônticas persistentes, *Enterococcus faecalis* recebe atenção por sua frequência em dentes previamente tratados e por sua capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis. Biofilme, tolerância a variações de pH, privação de nutrientes e aquisição de determinantes de resistência contribuem para sua persistência (ELASHIRY, 2023; BARBOSA-RIBEIRO et al., 2024).

Isolados de *Enterococcus* provenientes de infecções endodônticas apresentam diferentes perfis de resistência. A heterogeneidade entre estudos impede generalizações simples, mas sustenta a importância do uso criterioso de antimicrobianos e da vigilância microbiológica (ARDILA, 2023; BARBOSA-RIBEIRO et al., 2024).

A organização em biofilme aumenta a tolerância microbiana por dificultar a difusão de agentes, alterar o metabolismo celular e favorecer subpopulações persistentes. Esses mecanismos ajudam a explicar por que o preparo químico-mecânico pode reduzir a carga microbiana sem eliminar completamente a infecção (YANG *et al.*, 2024).

As estratégias em investigação incluem novos irrigantes, agentes antibiofilme, materiais com atividade antimicrobiana e sistemas de liberação controlada. Revisões de extratos vegetais como irrigantes mostram resultados in vitro heterogêneos e destacam a necessidade de padronização antes da aplicação clínica (DIOUCHI, 2024).

Hidrogéis e outros carreadores têm sido estudados na engenharia de tecidos odontológicos por permitirem liberação local de compostos e suporte ao reparo. A

atividade antimicrobiana, a citocompatibilidade e a estabilidade dessas formulações precisam ser avaliadas em conjunto (ATILA, 2023).

O controle microbiológico endodôntico depende da anatomia do canal, da composição do biofilme, da susceptibilidade microbiana e das propriedades do agente empregado. Novas substâncias devem ser comparadas com os protocolos existentes por desfechos microbiológicos e de segurança.

3.2 Infecções endodônticas

As infecções endodônticas são classificadas como primárias, secundárias ou persistentes conforme a história do dente e o momento de estabelecimento microbiano. Em todas elas, os microrganismos podem organizar-se em comunidades aderidas às paredes do canal (SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 2024).

Infecções primárias ocorrem em dentes sem tratamento endodôntico prévio e costumam apresentar microbiota diversificada, com predomínio de anaeróbios. Gêneros como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Treponema* foram descritos em associação com periodontite apical (SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 2024).

Infecções secundárias são introduzidas durante ou após o tratamento, enquanto infecções persistentes permanecem apesar dos procedimentos realizados. *Enterococcus faecalis* é uma das espécies mais estudadas nesse contexto por tolerar privação de nutrientes, alcalinidade e outros estresses ambientais (ELASHIRY, 2023; YANG et al., 2024).

O sequenciamento de nova geração ampliou a detecção de microrganismos não cultiváveis e confirmou a natureza polimicrobiana das infecções radiculares. Esses métodos também mostram mudanças na comunidade após os procedimentos de desinfecção (ALQURIA *et al.*, 2024; SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 2024).

Aboushadi, Albelasy e Ordinola-Zapata (2024) avaliaram a associação entre sintomas endodônticos e grupos bacterianos específicos. Os resultados indicam associações entre composição microbiana e apresentação clínica, sem permitir que a presença de um único táxon determine isoladamente a sintomatologia.

A matriz do biofilme, a proximidade entre células e a heterogeneidade metabólica aumentam a tolerância à desinfecção. Por isso, ensaios de novos agentes devem incluir modelos de biofilme e métodos que diferenciem redução de biomassa, perda de viabilidade e desorganização estrutural (YANG et al., 2024; DIOUCHI; TOURÉ; GHOUL, 2024).

A eficácia contra células planctônicas não garante atividade em biofilmes maduros ou em túbulos dentinários. A progressão para modelos endodônticos deve ocorrer apenas após a demonstração reprodutível de atividade em condições controladas.

3.3 Extratos naturais amazônicos

A biodiversidade amazônica contém espécies ricas em metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, terpenos e alcaloides. Esses compostos apresentam atividades biológicas diversas, mas a magnitude do efeito depende da espécie, da parte vegetal e do processo de extração (PAES *et al.*, 2025).

Compostos fenólicos de plantas amazônicas são frequentemente associados à atividade antioxidante. A extrapolação para efeitos anti-inflamatórios ou antimicrobianos exige ensaios específicos, porque composição química e concentração variam entre preparações (PAES *et al.*, 2025).

Na Odontologia, extratos vegetais têm sido avaliados contra microrganismos planctônicos e biofilmes. Os resultados disponíveis são predominantemente laboratoriais e variam quanto ao solvente, à concentração, ao organismo-alvo e ao método de leitura (RODRIGUES et al., 2024; DIOUCHI, 2024).

A fitoterapia pode fornecer moléculas candidatas para produtos odontológicos, mas cada preparação requer caracterização química, avaliação microbiológica e análise de segurança. A origem natural não assegura eficácia nem baixa toxicidade (CASARIL *et al.*, 2025).

Tecnologias de encapsulação podem modificar solubilidade, estabilidade e liberação de compostos vegetais. Contudo, o benefício depende da formulação e deve

ser confirmado por comparação direta com o extrato não encapsulado (GOKTAS et al., 2020).

A biodiversidade amazônica oferece fontes para prospecção de compostos, mas a transição para uso clínico requer padronização do material vegetal, reprodutibilidade do processo de extração, avaliação toxicológica e estudos em modelos progressivamente mais próximos da prática.

3.4 Açaí

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) contém antocianinas, flavonoides, procianidinas, lipídios e outros constituintes. A distribuição desses compostos varia entre epicarpo, polpa e semente, assim como entre solventes e formas de processamento (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

A capacidade antioxidante do açaí é atribuída principalmente à sua fração fenólica. Esse desfecho químico não equivale a atividade antimicrobiana e deve ser interpretado separadamente de efeitos sobre crescimento ou viabilidade bacteriana (SCHAUSS *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

Estudos microbiológicos com derivados do açaí empregaram diferentes frações e preparações. Mecanismos atribuídos a polifenóis, como alteração da membrana ou interferência na adesão, constituem hipóteses gerais e não podem ser transferidos automaticamente para todo extrato de *Euterpe oleracea* (DAGLIA, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2024).

Os dados disponíveis justificam investigar derivados do açaí contra microrganismos orais, mas ainda são insuficientes para recomendar uso clínico. A atividade deve ser demonstrada para a preparação específica e comparada com controles e agentes de referência.

Ácidos graxos e fitoesteróis também integram a composição do fruto. Sua presença amplia o interesse químico da espécie, embora não demonstre, isoladamente, atividade contra *Enterococcus faecalis* (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

Formulações concentradas ou nanoestruturadas podem alterar a disponibilidade dos constituintes do açaí. Essas estratégias devem ser consideradas etapas futuras, posteriores à identificação da fração ativa e à demonstração reprodutível de efeito (GOKTAS et al., 2020).

O açaí constitui uma matriz química heterogênea. A avaliação de seu potencial odontológico exige separar os efeitos de cada fração, solvente e formulação.

3.4.1 Atividade antimicrobiana de derivados de açaí

A atividade antimicrobiana atribuída ao açaí varia conforme a parte do fruto e a preparação. Antocianinas e procianidinas são candidatas de interesse, mas sua presença não garante inibição de todos os microrganismos.

Silva *et al.* (2023) descreveram propriedades químicas e biológicas de farinha de açaí rica em compostos fenólicos. A preparação e os microrganismos avaliados diferem do extrato metanólico do epicarpo e de *Enterococcus faecalis*, o que limita a comparação direta.

Estudos com sementes destacam procianidinas e outros constituintes com potencial biológico. O aproveitamento desse resíduo agroindustrial justifica a comparação futura entre sementes e epicarpo, desde que os extratos sejam caracterizados e testados sob o mesmo delineamento (PINHEIRO, 2025).

Melhorança Filho e Pereira (2012) avaliaram óleo da semente de açaí contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O óleo não formou halo de inibição contra *P. aeruginosa*, mas apresentou atividade contra *S. aureus*. O resultado reforça que a resposta depende do microrganismo e da fração vegetal e explica o interesse em investigar sementes em estudos posteriores.

A literatura sobre derivados do açaí reúne preparações distintas quanto à parte do fruto, ao método de extração e ao desfecho microbiológico. Portanto, resultados positivos com óleo de sementes, polpa ou formulações para terapia fotodinâmica não demonstram, por si só, atividade do extrato metanólico do epicarpo. A evidência disponível sustenta a investigação de *E. oleracea* como fonte de compostos bioativos, mas ainda não autoriza sua indicação como irrigante ou agente antibiofilme. Ensaios

comparáveis, controles de veículo e métodos que diferenciem biomassa de viabilidade são necessários antes de qualquer inferência clínica.

3.5 Lacunas na literatura e justificativa para a pesquisa

Apesar dos avanços nos protocolos de desinfecção, a anatomia do sistema de canais e a organização em biofilme favorecem a persistência microbiana. *Enterococcus faecalis* é utilizado em modelos laboratoriais por sua tolerância a condições adversas e sua relevância em infecções pós-tratamento (SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 2024).

O hipoclorito de sódio combina ação antimicrobiana e dissolução de matéria orgânica, mas pode lesar tecidos quando extravasado. A clorexidina apresenta substantividade, porém não dissolve tecido orgânico. Essas características motivam a busca por agentes complementares sem reduzir a importância dos protocolos estabelecidos (ZEHNDER, 2006; GOMES *et al.*, 2013).

A resistência antimicrobiana reforça a necessidade de uso racional de antibióticos e de métodos locais eficazes. A eventual seleção de fenótipos mais tolerantes por exposições subletais é uma hipótese que requer delineamentos próprios e não foi avaliada neste estudo.

Euterpe oleracea é uma das espécies amazônicas investigadas como fonte de compostos bioativos. Resultados obtidos com polpa, sementes ou óleo indicam que a fração vegetal influencia a resposta e não permitem prever a atividade do epicarpo (SCHAUSS *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

A comparação entre estudos é limitada pela diversidade de métodos de extração, concentrações, solventes, microrganismos e desfechos. Além disso, modelos planctônicos não reproduzem a complexidade de biofilmes maduros no sistema de canais. A padronização dessas variáveis é necessária para estimar a reprodutibilidade e a relevância dos resultados.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção do extrato natural amazônico

Foi utilizado extrato metanólico do epicarpo (casca do fruto) de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), cedido pela Profa. Dra. Klenicy Kazumi Yamaguchi de Lima, do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Campus Coari, Amazonas.

4.2 Preparação da linhagem bacteriana

Foi utilizada a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, obtida de banco de cultura. A cepa foi cultivada em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C, em aerobiose. Os meios foram preparados conforme as recomendações do fabricante e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Alíquotas foram semeadas, com alça bacteriológica estéril, em placas de Petri contendo ágar BHI. As placas inoculadas foram incubadas a 37 °C, em aerobiose, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento foi inspecionado quanto à morfologia colonial e a sinais de contaminação. Colônias isoladas foram selecionadas para subcultivo, com o objetivo de manter a viabilidade e a pureza da cepa durante os experimentos. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em condições assépticas.

4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, com adaptações do documento CLSI M07-A10 (CLSI, 2015).

A solução estoque do extrato foi preparada em metanol. Culturas bacterianas frescas foram obtidas das placas previamente incubadas e padronizadas para o ensaio.

As concentrações nominais avaliadas foram 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL. Elas foram preparadas a partir da solução estoque metanólica do extrato e de caldo BHI, em placas estéreis de 96 poços. Essas foram as concentrações efetivamente utilizadas nos ensaios.

Os poços receberam inóculo para concentração final aproximada de 5×10^5 UFC/mL e volume final de 125 µL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após 24 horas, adicionou-se resazurina como indicador de atividade metabólica. A CIM foi definida como a menor concentração sem mudança de cor compatível com crescimento bacteriano.

Cada placa incluiu controle positivo de crescimento, controle negativo de esterilidade e controle de veículo com a mesma proporção de metanol empregada nos tratamentos. O ensaio foi realizado em três repetições experimentais independentes, com três réplicas técnicas em cada placa.

4.4 Cinética bacteriana

A cinética bacteriana foi acompanhada nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 mg/mL. Culturas padronizadas em aproximadamente 5×10^5 UFC/mL foram incubadas em BHI a 37 °C. Amostras de 10 µL foram coletadas em 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, submetidas às diluições previstas no conjunto de dados, plaqueadas em ágar BHI e incubadas por 24 horas antes da contagem. O controle positivo foi submetido ao mesmo acompanhamento. Cada repetição experimental foi composta por três réplicas técnicas. As concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 mg/mL foram avaliadas em quatro repetições independentes cada ($n = 4$). O delineamento de nove concentrações corresponde a 36 combinações concentração × repetição independente, com três réplicas técnicas e seis tempos de avaliação por combinação (até 648 leituras previstas em um acompanhamento completo).

4.5 Avaliação da aderência

Para a avaliação de aderência, adotou-se uma adaptação do protocolo de Stepanović et al. (2000). Foram adicionados 25 µL da suspensão de *E. faecalis* (aproximadamente 5×10^5 UFC/mL) a 100 µL das concentrações do extrato em placas de 96 poços. O controle positivo recebeu 25 µL da suspensão bacteriana e 100 µL de água destilada autoclavada; o controle de veículo recebeu 10 µL de metanol, 90 µL de BHI e 25 µL da suspensão bacteriana; o controle negativo continha BHI sem inóculo. Após incubação a 37 °C por 24 horas, as placas foram lavadas três vezes com água destilada e secas à temperatura ambiente. Os poços foram fixados com 250 µL de metanol por 15 minutos. Após remoção do metanol e nova secagem, o material retido foi corado com cristal violeta por 10 minutos, lavado, seco e solubilizado com 250 µL de ácido acético glacial a 33%.

A absorbância foi lida a 540 nm. Como o extrato apresentava pigmentação e precipitação visíveis, o sinal óptico foi interpretado como absorbância total do ensaio, sem equivalência automática com biomassa bacteriana. O ensaio foi conduzido em três repetições experimentais independentes, com 3 réplicas técnicas conforme o delineamento da placa.

4.6 Análise estatística

4.6.1 Análise longitudinal da contagem bacteriana

As contagens foram convertidas em UFC/mL conforme o volume plaqueado e a diluição correspondente e transformadas por log10(UFC/mL + 1). Registros classificados como incontáveis foram codificados no limite operacional de 300 colônias antes da conversão. Essa codificação representa censura superior e foi considerada uma limitação na interpretação.

O delineamento com quatro repetições independentes para cada uma das nove concentrações e três réplicas técnicas em seis tempos corresponde a até 648 leituras planejadas. A base utilizada no ajuste continha 774 observações vinculadas a 125 identificadores de unidade experimental; esses identificadores analíticos devem ser conferidos frente às 36 combinações concentração × repetição do delineamento. Ajustou-se um modelo linear misto com intercepto aleatório por unidade experimental e correlação autorregressiva de primeira ordem, adequada à dependência entre medidas sucessivas. A concentração foi incluída como fator; o tempo, por termos linear e quadrático; e o experimento, como efeito de ajuste. Também foram avaliadas as interações da concentração com os termos temporais. Os graus de liberdade foram calculados pelo método de contenção.

As médias marginais estimadas foram obtidas para cada combinação de concentração e tempo. As 36 comparações entre concentrações dentro de cada tempo receberam ajuste de Holm. Adotou-se $\alpha = 0,05$. As análises foram executadas no jamovi 2.7 e no R 4.5; os gráficos apresentam médias estimadas e intervalos de confiança de 95%, calculados a partir dos erros-padrão do modelo.

4.6.2 Análise do ensaio de aderência

A análise do ensaio de aderência incluiu 828 leituras, distribuídas entre três grupos (Teste, Controle positivo + metanol e Controle negativo) e 12 concentrações

(0,009 a 20 mg/mL). Conforme o conjunto analítico final, cada leitura foi mantida como observação independente, sem agregação ou exclusão de linhas por duplicação. A absorbância foi analisada por ANOVA fatorial Tipo III, com grupo, concentração e interação grupo × concentração como efeitos fixos. Foram calculados F, p, eta quadrado parcial e os coeficientes de determinação do modelo.

A normalidade dos resíduos foi examinada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Fligner-Killeen. Diante da violação desses pressupostos, realizou-se análise de sensibilidade com correção robusta HC3. As concentrações foram comparadas no grupo Teste pelo procedimento de Tukey, e os três grupos foram comparados dentro de cada concentração pelo procedimento de Tukey-Kramer. Adotou-se $\alpha = 0,05$. Como o extrato apresentava pigmentação e precipitação, todas as inferências foram limitadas ao sinal de absorbância, sem equivalência automática com biomassa ou aderência bacteriana.

4.7 **Controle de qualidade e repetições**

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em três repetições experimentais independentes, com réplicas técnicas em cada placa. Na cinética bacteriana, cada repetição experimental foi composta por três réplicas técnicas. As concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 mg/mL foram avaliadas em quatro repetições experimentais independentes cada ($n = 4$), totalizando 36 combinações concentração × repetição, ou 108 séries técnicas com três réplicas por combinação. A avaliação da aderência foi realizada em três repetições experimentais, com o número de leituras previsto no delineamento de cada grupo. Na análise longitudinal, réplicas técnicas, diluições bacterianas e tempos de avaliação foram medidas dentro das respectivas unidades experimentais e não foram contabilizados como novas repetições. Na análise específica de aderência, as 828 leituras foram mantidas como observações independentes, conforme o conjunto analítico final. Controles positivo, negativo e de veículo foram incluídos conforme a finalidade de cada ensaio. Na cinética, o controle positivo apresentou contagens de 0, 21 e 55 colônias no tempo inicial (T0); nos tempos subsequentes, as contagens foram superiores a 300 colônias e registradas como incontáveis (INC).

4.8 Uso de inteligência artificial na construção do trabalho

Durante o desenvolvimento deste estudo, foi utilizada a ferramenta de inteligência artificial generativa ChatGPT, desenvolvida pela OpenAI, como apoio à organização de informações, revisão linguística, tradução de textos e estruturação inicial de códigos para análises estatísticas. A escolha dos modelos estatísticos, a conferência dos dados experimentais, a interpretação dos resultados e a revisão e aprovação do conteúdo científico permaneceram sob responsabilidade do pesquisador. As análises estatísticas definitivas foram realizadas nos softwares jamovi e R, sendo seus resultados conferidos e confrontados com os dados experimentais originais..

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima

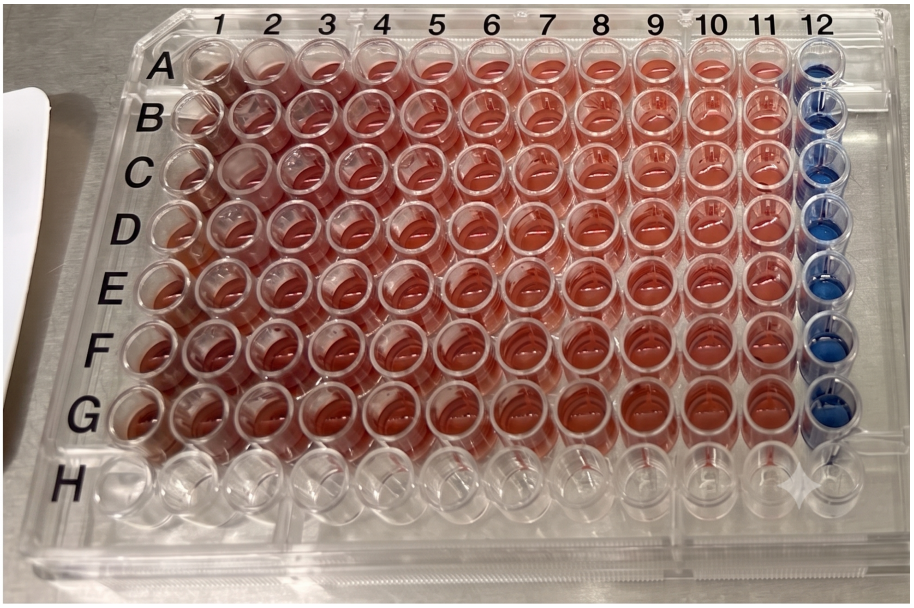
A microdiluição em caldo com resazurina avaliou a atividade do extrato metanólico do epicarpo de *E. oleracea* contra *E. faecalis*.

Os controles validaram a leitura: o controle negativo manteve a coloração compatível com esterilidade; o controle positivo mostrou atividade metabólica microbiana; e o controle de veículo apresentou crescimento, sem evidência de inibição pelo metanol na proporção empregada.

Nas colunas 1 a 9, correspondentes às concentrações de 20 a 0,0625 mg/mL, houve mudança da resazurina compatível com atividade metabólica bacteriana. A coluna 10 correspondeu ao controle de veículo, a coluna 11 ao controle positivo de crescimento e a coluna 12 ao controle negativo de esterilidade.

Nenhuma concentração testada impediu visualmente o crescimento após 24 horas. Assim, a CIM foi superior a 20 mg/mL. Esse resultado informa apenas que a CIM não foi alcançada no intervalo avaliado; não permite estimar qual concentração acima desse limite produziria inibição.

Figura 1 – *Resultado do ensaio de concentração inibitória mínima do extrato metanólico do epicarpo de açaí contra Enterococcus faecalis, avaliado por microdiluição em caldo com resazurina utilizando as concentrações 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL.*



Fonte: Acervo do autor (2026).

Nota: As colunas 1 a 9 contêm, respectivamente, 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL; a coluna 10 corresponde ao controle de veículo, a coluna 11 ao controle positivo e a coluna 12 ao controle negativo. As linhas A a G exibem os poços preenchidos, enquanto a linha H aparece sem os reagentes visíveis. A coloração compatível com atividade metabólica em todas as concentrações estabeleceu CIM > 20 mg/mL.

5.2 Cinética bacteriana

5.2.1 Modelo linear misto

O modelo linear misto foi ajustado sobre 774 observações agrupadas em 125 identificadores de unidade registrados na base analítica, com intercepto aleatório e correlação AR(1) entre medidas sucessivas. O delineamento declarado prevê 36 combinações independentes (nove concentrações × quatro repetições); a correspondência com os identificadores do banco deve ser verificada. A análise foi realizada sobre log10(UFC/mL + 1), com ajuste por experimento.

Não houve efeito global de concentração (p = 0,9936). Os termos linear e quadrático do tempo e o efeito de experimento foram significativos (p < 0,05). As interações entre concentração e os termos temporais permaneceram acima de 0,05, embora próximas do limiar. Portanto, o modelo não sustenta uma resposta antimicrobiana global dependente da concentração.

Tabela 1 – *Efeitos da concentração(20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL), do tempo, do experimento e das interações no modelo linear misto da contagem de Enterococcus faecalis, expressa em log10(UFC/mL + 1), durante 24 horas*

Efeito	Representação	p	Interpretação
Concentração	Fator	0,9936	Não significativo
Tempo linear	Contínuo	< 0,05	Significativo
Tempo quadrático	Contínuo	< 0,05	Significativo
Experimento	Ajuste	< 0,05	Significativo
Concentração × tempo linear	Interação	> 0,05	Limítrofe
Concentração × tempo quadrático	Interação	> 0,05	Limítrofe

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

5.2.2 Médias estimadas e comparações múltiplas

As médias estimadas aumentaram ao longo do acompanhamento na maioria das condições. A concentração de 1 mg/mL apresentou valores menores em parte dos tempos intermediários. Após correção de Holm, não houve diferenças entre

concentrações em 0, 2 ou 24 horas; as diferenças significativas concentraram-se nas avaliações intermediárias de 4, 8 e 12 horas e envolveram principalmente comparações de 1 mg/mL com outras concentrações.

Esse achado é específico de tempos e contrastes determinados. Como o efeito global de concentração não foi significativo e as interações permaneceram acima de 0,05, ele foi interpretado como sinal exploratório, sem caracterização de gradiente dose-resposta, efeito bactericida ou mecanismo de liberação tardia.

5.2.3 Controle positivo

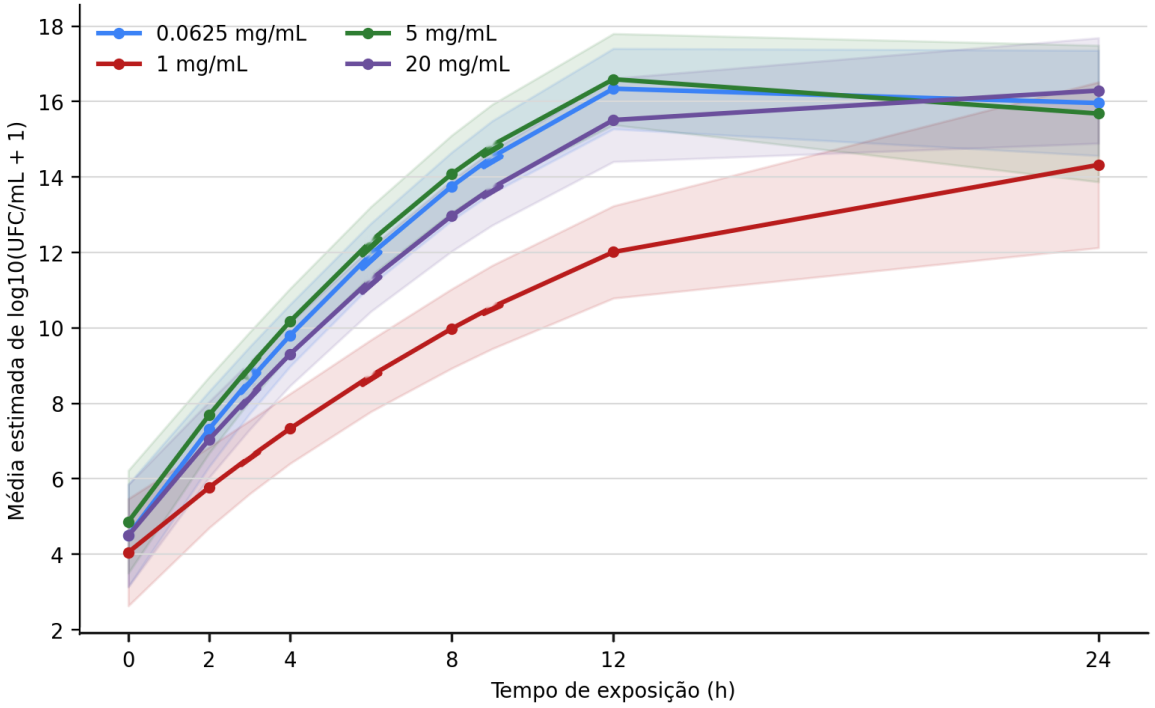
No controle positivo, as três contagens em T0 foram 0, 21 e 55 colônias. A partir de T2, os registros foram classificados como incontáveis. O controle confirmou a capacidade de crescimento do inóculo e contextualizou o aumento temporal observado nas condições tratadas.

A codificação dos registros incontáveis pelo limite de 300 colônias viabilizou a análise numérica, mas comprimiu valores acima do limite de contagem. Por isso, diferenças nas faixas superiores devem ser lidas com cautela.

5.2.4 Síntese dos achados longitudinais

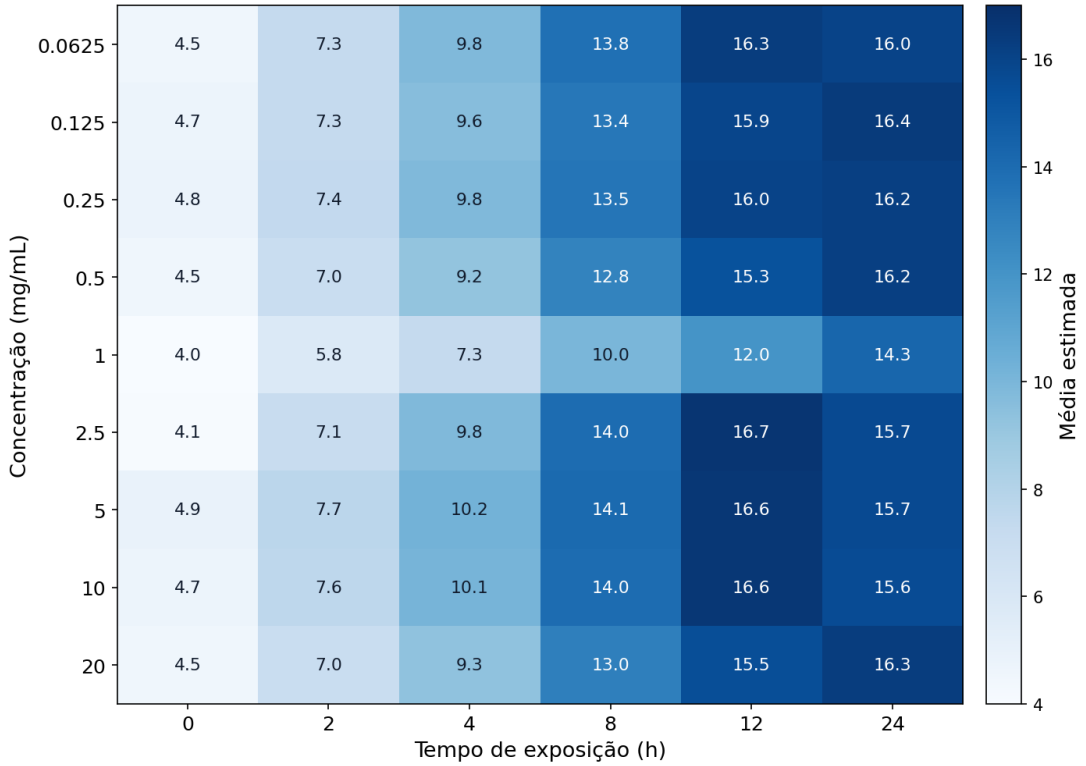
A principal evidência foi temporal, e não relacionada à dose. O comportamento transitório de 1 mg/mL merece replicação independente, com menor frequência de placas incontáveis e limites de quantificação previamente definidos.

Figura 2 – *Médias marginais estimadas da contagem de Enterococcus faecalis em concentrações representativas do extrato metanólico do epicarpo de açaí nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, com intervalos de confiança de 95% do ajuste original.*



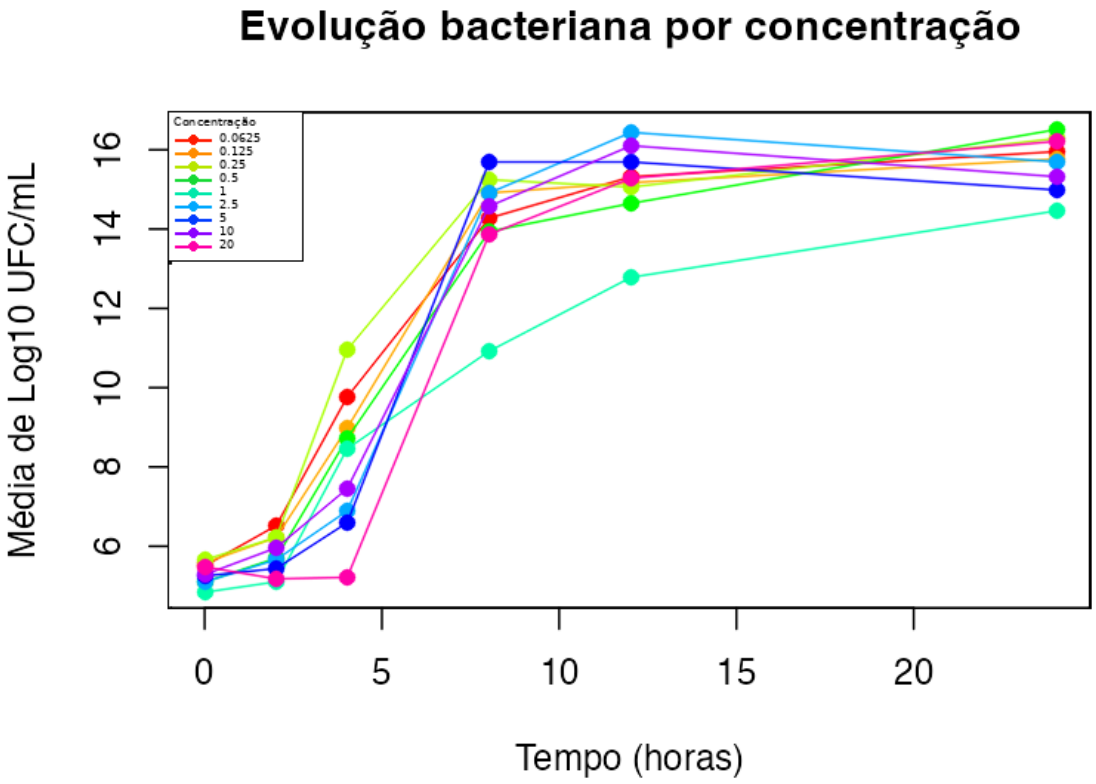
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).
Nota: Foram apresentadas concentrações representativas para evitar sobreposição de linhas. As faixas sombreadas correspondem aos intervalos de confiança de 95% calculados a partir dos erros-padrão do modelo misto. A concentração de 1 mg/mL apresentou médias menores em tempos intermediários, sem diferença entre concentrações em 24 horas.

Figura 3 – *Distribuição das médias marginais estimadas da contagem de Enterococcus faecalis segundo a concentração do extrato metanólico do epicarpo de açaí e os tempos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas.*



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).
Nota: Os valores menores para 1 mg/mL em 4, 8 e 12 horas constituem achado específico. A visualização apresenta apenas os seis tempos selecionados. A ausência de gradiente monotônico e o efeito global de concentração não significativo afastam a interpretação de dose-resposta.

Figura 4 – Evolução da contagem média de *Enterococcus faecalis* nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas nas diferentes concentrações do extrato metanólico do epicarpo de açaí.



Fonte: Elaborado pelo autor no R, por meio do módulo Rj do jamovi (2026).
Nota: As cores identificam as concentrações testadas e as linhas conectam as médias observadas. A figura é descritiva e não substitui a inferência do modelo linear misto, que não indicou efeito global de concentração.

5.3 Ensaio de aderência

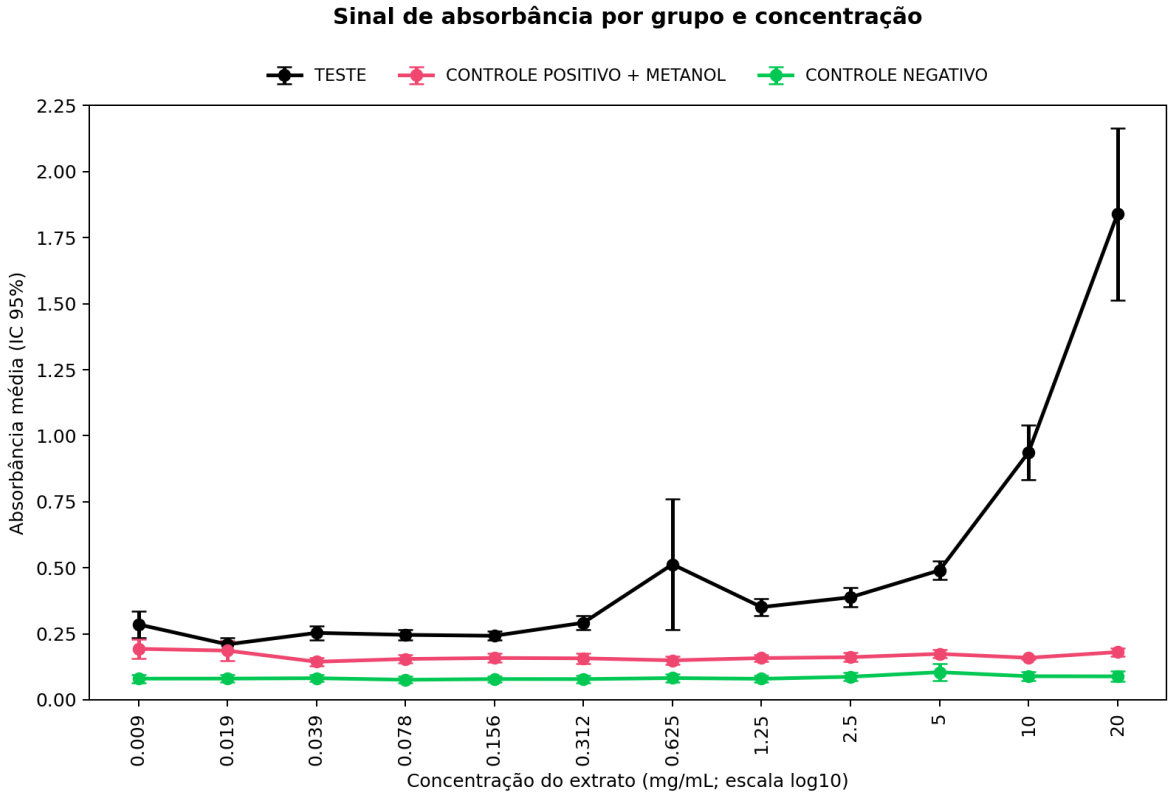
Foram analisadas 828 leituras de absorbância: 27 por concentração no grupo Teste, 18 por concentração no Controle positivo + metanol e 24 por concentração no Controle negativo. A distribuição do sinal por grupo e concentração é apresentada na Figura 5. No grupo Teste, as médias variaram de 0,210 ± 0,061 em 0,019 mg/mL a 1,839 ± 0,821 em 20 mg/mL. Os controles permaneceram em faixas inferiores e relativamente estáveis, conforme a Tabela 3.

A ANOVA fatorial Tipo III indicou efeito de grupo, $F(2, 792) = 375,91$; $p < 0,0001$; $\eta p^2 = 0,487$, efeito de concentração, $F(11, 792) = 41,54$; $p < 0,0001$; $\eta p^2 = 0,366$, e interação grupo × concentração, $F(22, 792) = 43,90$; $p < 0,0001$; $\eta p^2 = 0,549$. O modelo explicou 74,9% da variância (R^2 ajustado = 0,738).

Os resíduos não apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk: $W = 0,48$; $p < 0,0001$), e houve heterogeneidade entre as 36 células do delineamento (Fligner-Killeen: $\chi^2(35) = 223$; $p < 0,0001$). Na análise de sensibilidade com correção HC3, permaneceram significativos os efeitos de grupo, $F(2, 792) = 465,81$; $p < 0,0001$, concentração, $F(11, 792) = 39,26$; $p < 0,0001$, e interação, $F(22, 792) = 21,59$; $p < 0,0001$. Essa concordância sustentou a existência de diferenças no sinal óptico, embora os valores da ANOVA convencional devam ser interpretados considerando a violação dos pressupostos.

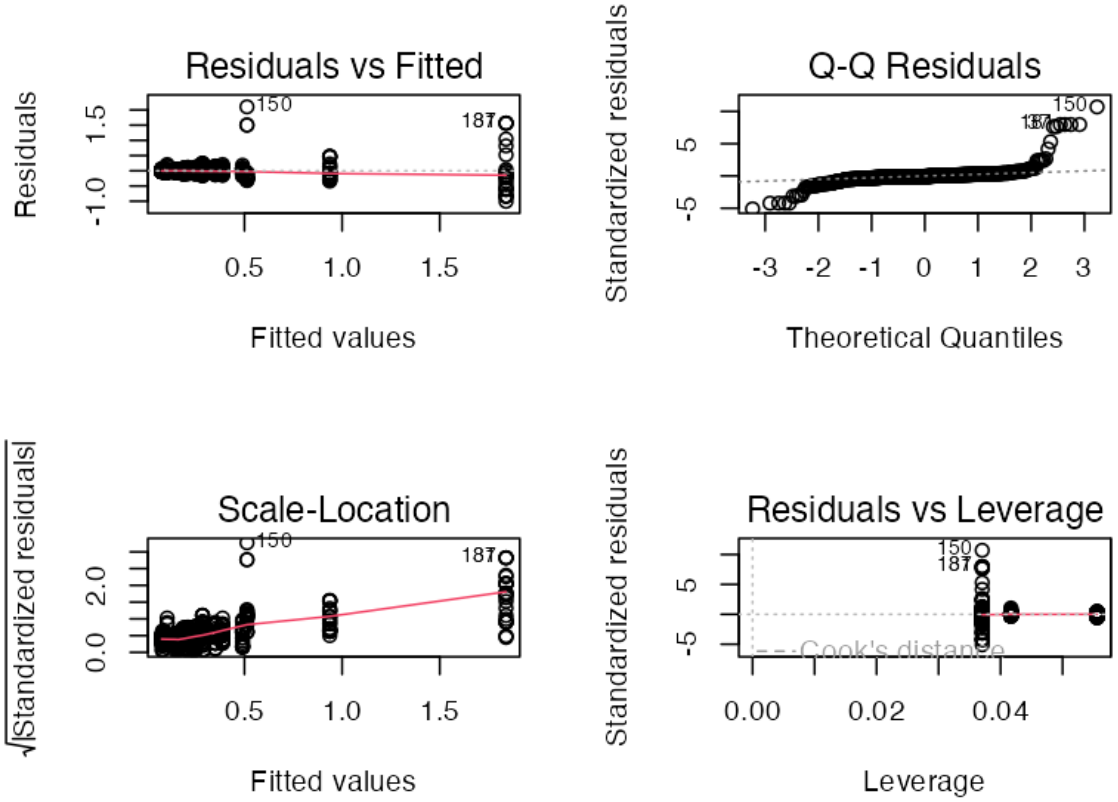
No Tukey-Kramer, o grupo Teste apresentou absorbância superior ao Controle negativo em 0,009 mg/mL e de 0,039 a 20 mg/mL (p ajustado < 0,05); em 0,019 mg/mL, o contraste não alcançou significância (p = 0,055). A diferença Teste − Controle negativo foi máxima em 20 mg/mL: 1,751 unidade de absorbância (IC95%: 1,619 a 1,882; p ajustado < 0,0001). O Teste também superou o Controle positivo + metanol de 0,625 a 20 mg/mL (p ajustado < 0,05), enquanto os dois controles não diferiram entre si em nenhuma concentração (p ajustado > 0,05). Entretanto, pigmentação e precipitação observadas na placa impedem atribuir essas diferenças exclusivamente à biomassa ou à formação de biofilme. O resultado demonstra aumento de absorbância no sistema ensaiado, não aumento confirmado de aderência bacteriana.

Figura 5 – Média do sinal de absorbância a 540 nm no ensaio de cristal violeta segundo o grupo experimental e a concentração do extrato metanólico do epicarpo de açaí, com intervalos de confiança de 95%.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir das saídas do R no módulo Rj do jamovi (2026).
Nota: Os pontos representam as médias e as barras, os intervalos de confiança de 95%. O aumento do sinal óptico no grupo Teste não deve ser interpretado isoladamente como aumento de biomassa ou de aderência, devido à pigmentação e à precipitação observadas.

Figura 6 – Avaliação gráfica da normalidade, homogeneidade das variâncias e observações influentes na ANOVA fatorial aplicada ao sinal de absorbância do ensaio de cristal violeta.



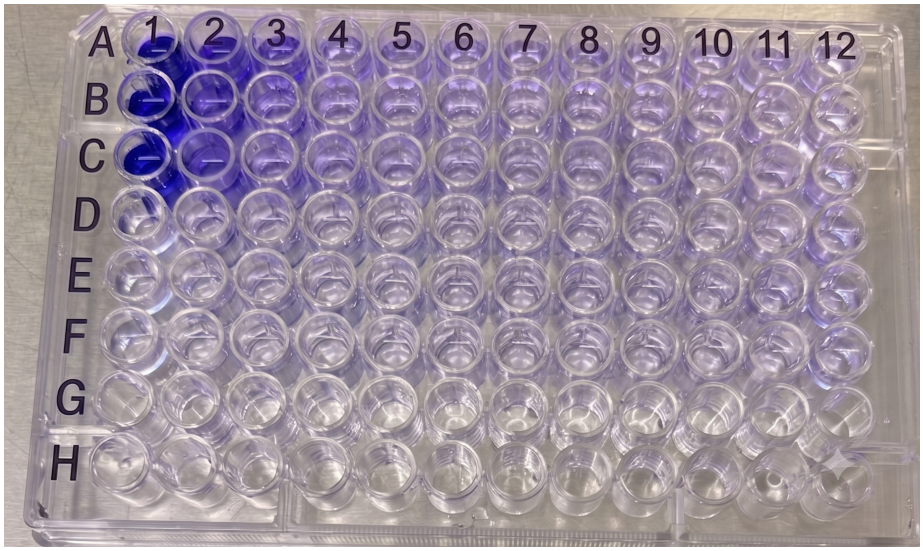
Fonte: Elaborado pelo autor no R, por meio do módulo Rj do jamovi (2026).
Nota: Os gráficos de resíduos, quantis, dispersão e alavancagem mostram desvios de normalidade e heterogeneidade das variâncias, justificando a análise de sensibilidade com correção robusta HC3.

Tabela 2 – **Média e desvio-padrão da absorbância a 540 nm nos grupos teste, controle positivo com metanol e controle negativo, nas doze concentrações do extrato metanólico do epicarpo de açaí**

Concentração (mg/mL)	Teste (n = 27)	Controle positivo + metanol (n = 18)	Controle negativo (n = 24)
0,009	0,285 ± 0,126	0,193 ± 0,073	0,080 ± 0,037
0,019	0,210 ± 0,061	0,186 ± 0,075	0,080 ± 0,032
0,039	0,253 ± 0,068	0,144 ± 0,029	0,082 ± 0,030
0,078	0,246 ± 0,050	0,154 ± 0,031	0,076 ± 0,030
0,156	0,242 ± 0,043	0,158 ± 0,034	0,078 ± 0,027
0,312	0,292 ± 0,068	0,157 ± 0,038	0,078 ± 0,034
0,625	0,513 ± 0,624	0,149 ± 0,029	0,082 ± 0,037
1,250	0,351 ± 0,084	0,158 ± 0,027	0,079 ± 0,032
2,500	0,388 ± 0,090	0,161 ± 0,033	0,087 ± 0,038
5,000	0,490 ± 0,086	0,174 ± 0,031	0,104 ± 0,073
10,000	0,937 ± 0,264	0,159 ± 0,010	0,089 ± 0,043
20,000	1,839 ± 0,821	0,181 ± 0,030	0,089 ± 0,047

Nota: valores expressos como média ± desvio-padrão. Cada concentração incluiu 27 leituras no grupo Teste, 18 no Controle positivo + metanol e 24 no Controle negativo. Fonte: dados da pesquisa (2026).

Figura 7 – Aspecto macroscópico da placa após o ensaio de cristal violeta, evidenciando pigmentação e precipitação nas maiores concentrações do extrato metanólico do epicarpo de açaí.



Fonte: Acervo do autor (2026).
Nota: A pigmentação e a presença de material precipitado aumentaram nas maiores concentrações, evidenciando possível interferência físico-química na leitura óptica.

6 DISCUSSÃO

Este estudo produziu três achados principais. O extrato metanólico do epicarpo de *Euterpe oleracea* não inibiu visualmente *E. faecalis* até 20 mg/mL. Na análise longitudinal, a concentração não apresentou efeito global, enquanto o tempo e o experimento explicaram parte relevante da variação. No ensaio de cristal violeta, o aumento de absorbância ocorreu junto à pigmentação e à precipitação do extrato, o que limita sua interpretação como aderência bacteriana.

A CIM superior a 20 mg/mL deve ser interpretada como ausência de inibição no intervalo estudado. Esse resultado é válido e delimita a eficácia do extrato bruto do epicarpo nas condições empregadas. Ele não informa a CIM exata acima de 20 mg/mL e não deve ser convertido em evidência de atividade bacteriostática. A literatura sobre açaí inclui frações e formulações diferentes. Penna Felisberto et al. (2025), por exemplo, estudaram uma preparação de açaí como fotossensibilizador em modelo endodôntico; essa condição não é diretamente comparável ao extrato metanólico bruto do epicarpo.

A comparação com outros estudos exige considerar a parte do fruto utilizada. Melhorança Filho e Pereira (2012) observaram atividade do óleo da semente de açaí contra *Staphylococcus aureus*, mas não contra *Pseudomonas aeruginosa*. Diferenças na fração vegetal, no solvente, na composição química e no organismo-alvo podem alterar a atividade. Assim, resultados obtidos com semente, polpa ou formulações fotoativadas justificam novas investigações, mas não contradizem a ausência de inibição observada neste estudo.

O modelo misto foi escolhido porque as medidas sucessivas da mesma unidade experimental não são independentes. A estrutura AR(1) representou a maior correlação esperada entre tempos próximos, e o intercepto aleatório incorporou a heterogeneidade entre unidades. Após esse ajuste, o efeito global de concentração foi nulo ($p = 0,9936$). Em contraste, os componentes linear e quadrático do tempo e o efeito de experimento foram significativos. O aumento das médias ao longo do acompanhamento, também observado no controle positivo, é compatível com crescimento bacteriano e não com morte sustentada.

Nas comparações originalmente calculadas pelo modelo, a concentração de 1 mg/mL apresentou médias estimadas menores nos tempos mantidos de 4, 8 e 12 horas. A apresentação restrita a esses seis horários não constitui uma nova análise

inferencial. Não houve diferença em 0, 2 ou 24 horas. Esse padrão não foi monotônico, pois concentrações superiores não produziram reduções progressivamente maiores. As interações concentração por tempo ficaram acima de 0,05. Portanto, o achado de 1 mg/mL deve ser tratado como sinal específico e exploratório, não como prova de efeito dose-dependente.

A variabilidade entre experimentos merece atenção porque o efeito de experimento foi significativo. Diferenças de inóculo, homogeneização, plaqueamento, diluição ou leitura podem contribuir para esse componente. A frequência de registros incontáveis acrescenta outra limitação: substituir esses registros por 300 colônias estabelece um limite mínimo para a carga real e comprime a variabilidade no topo da escala. O modelo longitudinal reduz o problema da correlação entre medidas, mas não elimina o viés introduzido pela censura de contagem.

No ensaio de aderência, os efeitos de grupo, concentração e interação foram estatisticamente significativos e apresentaram magnitudes elevadas. A interação foi o componente de maior tamanho de efeito ($\eta p^2 = 0,549$), refletindo que a variação da absorbância ao longo das concentrações diferiu entre os grupos. O crescimento do sinal concentrou-se no grupo Teste, sobretudo em 10 e 20 mg/mL, enquanto os controles permaneceram relativamente estáveis e não diferiram entre si. A persistência dos três efeitos na análise robusta HC3 indica que o achado não dependeu apenas da heterogeneidade das variâncias.

Essa significância estatística, contudo, não estabelece aumento de aderência ou de biofilme. O cristal violeta quantifica todo o material corado ou retido no poço e pode captar células, matriz extracelular, pigmentos e precipitados. Almutary e Sanderson (2016) descreveram interferências desse tipo em ensaios colorimétricos. A diferença de 1,751 unidade entre o Teste e o Controle negativo em 20 mg/mL ocorreu justamente na condição de maior pigmentação e precipitação visível. Além disso, a não normalidade dos resíduos e a heterogeneidade das variâncias recomendam cautela com as estimativas paramétricas e com as comparações pós-hoc. Sem brancos contendo extrato, veículo e cristal violeta em cada concentração, não é possível separar biomassa bacteriana de interferência físico-química. Também não há base experimental para afirmar que o extrato induziu resposta de estresse ou produção de matriz.

Em conjunto, os resultados não sustentam o uso do extrato metanólico bruto do epicarpo como antimicrobiano endodôntico nas concentrações avaliadas. A

ausência de efeito global de concentração, a CIM acima do maior valor testado e a incerteza do ensaio óptico impedem extrapolação para eficácia clínica. Esse resultado impede atribuir à preparação testada propriedades demonstradas apenas para outras frações ou formulações de *E. oleracea*.

Estudos futuros devem ampliar a faixa de concentrações somente após verificar solubilidade e compatibilidade do veículo; incluir brancos contendo extrato sem bactéria em cada concentração; definir previamente limites de contagem; reduzir a ocorrência de placas incontáveis; e combinar cristal violeta com métodos independentes de viabilidade, como contagem de UFC e microscopia. A comparação entre epicarpo, polpa, semente e óleo, com caracterização fitoquímica e controles equivalentes, poderá esclarecer se outra fração de *E. oleracea* apresenta atividade mais consistente contra *E. faecalis*.

7 CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo, o extrato metanólico bruto do epicarpo de *Euterpe oleracea* não apresentou inibição visual de *Enterococcus faecalis* entre 0,0625 e 20 mg/mL, resultando em CIM > 20 mg/mL.

Na cinética longitudinal, não houve efeito global de concentração ($p = 0,9936$). O tempo, sua componente quadrática e o experimento influenciaram as contagens, enquanto as interações entre concentração e tempo permaneceram acima de 0,05. As diferenças envolvendo 1 mg/mL nos tempos intermediários apresentados foram pontuais e exploratórias; não caracterizaram resposta dose-dependente nem efeito bactericida ou bacteriostático sustentado.

No ensaio de cristal violeta, grupo, concentração e interação influenciaram significativamente a absorbância, e a diferença entre o Teste e o Controle negativo atingiu 1,751 unidade em 20 mg/mL. Esses resultados demonstram aumento do sinal óptico, mas não permitem concluir que houve maior aderência ou formação de biofilme, porque pigmentação e precipitação do extrato podem ter contribuído para a leitura.

Portanto, os dados não apoiam a aplicação endodôntica do extrato testado como agente antimicrobiano. Eles estabelecem um limite experimental para essa preparação e orientam novos estudos com controles de interferência, métodos independentes de viabilidade e comparação de outras frações do fruto, especialmente sementes e óleo.

REFERÊNCIAS

ABOUSHADI, M. M.; ALBELASY, E. H.; ORDINOLA-ZAPATA, R. Association between endodontic symptoms and root canal microbiota: a systematic review and meta-analysis of bacteroidetes, spirochaetes and fusobacteriales. **Clinical Oral Investigations**, v. 28, n. 11, art. 593, 2024. DOI: 10.1007/s00784-024-05946-2. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00784-024-05946-2. Acesso em: 14 set. 2026.

ALMUTARY, A.; SANDERSON, B. J. The MTT and crystal violet assays: potential confounders in nanoparticle toxicity testing. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 4, p. 454–462, 2016. DOI: 10.1177/1091581816648906. Disponível em: https://doi.org/10.1177/1091581816648906. Acesso em: 14 set. 2026.

ALQURIA, T. A. et al. Impact of root canal disinfection on the bacteriome present in primary endodontic infection: a next generation sequencing study. **International Endodontic Journal**, v. 57, n. 8, p. 1124–1135, 2024. DOI: 10.1111/iej.14074. Disponível em: https://doi.org/10.1111/iej.14074. Acesso em: 14 set. 2026.

ARDILA, C.-M.; BEDOYA-GARCÍA, J.-A.; GONZÁLEZ-ARROYAVE, D. Antimicrobial resistance in patients with endodontic infections: a systematic scoping review of observational studies. **Australian Endodontic Journal**, v. 49, p. 386–395, 2023. DOI: 10.1111/aej.12680. Disponível em: https://doi.org/10.1111/aej.12680. Acesso em: 14 set. 2026.

ATILA, D.; KUMARAVEL, V. Advances in antimicrobial hydrogels for dental tissue engineering: regenerative strategies for endodontics and periodontics. **Biomaterials Science**, v. 11, n. 20, p. 6711–6747, 2023. DOI: 10.1039/d3bm00719g. Disponível em: https://doi.org/10.1039/d3bm00719g. Acesso em: 14 set. 2026.

BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. Antibiotic resistance profile of clinical strains of enterococci from secondary/persistent endodontic infections: what do we know? A systematic review of clinical studies. **Journal of Endodontics**, v. 50, n. 3, p. 299–309, 2024. DOI: 10.1016/j.joen.2023.12.007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.12.007. Acesso em: 14 set. 2026.

CASARIL, K. et al. Fitoterapia: aplicação de recursos naturais na promoção da saúde bucal. **Revista Multidisciplinar Pey Këyo Científico**, v. 11, n. 1, 2025. Disponível em: https://estacio.periodicoscientificos.com.br/index.php/pkcroraima/article/view/3772. Acesso em: 14 set. 2026.

CIEPLIK, F.; SCHOLZ, K. J.; AL-AHMAD, A. Antimicrobial resistance – a critical and timely challenge for dentistry and oral healthcare. **British Dental Journal**, v. 239, n. 10, p. 704–705, 2025. DOI: 10.1038/s41415-025-9380-1. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41415-025-9380-1. Acesso em: 14 set. 2026.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. 10. ed. Wayne, PA: CLSI, 2015. CLSI document M07-A10. Disponível em: https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/. Acesso em: 14 set. 2026.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007. Acesso em: 14 set. 2026.

DIOUCHI, J.; TOURÉ, B.; GHOUL, S. Antibiofilm efficacy of plant extracts as root canal irrigants in endodontics: a systematic literature review. **Frontiers in Dental Medicine**, v. 5, art. 1479953, 2024. DOI: 10.3389/fdmed.2024.1479953. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fdmed.2024.1479953. Acesso em: 14 set. 2026.

ELASHIRY, M. M.; BERGERON, B. E.; TAY, F. R. *Enterococcus faecalis* in secondary apical periodontitis: mechanisms of bacterial survival and disease persistence. **Microbial Pathogenesis**, v.

183, art. 106337, 2023. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106337. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106337. Acesso em: 14 set. 2026.

GOKTAS, Z. et al. Recent advances in nanoencapsulation of phytochemicals to combat obesity and its comorbidities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 31, p. 8119–8131, 2020. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c00131. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00131. Acesso em: 14 set. 2026.

GOMES, B. P. et al. Chlorhexidine in endodontics. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 2, p. 89–102, 2013. DOI: 10.1590/0103-6440201302188. Disponível em: https://doi.org/10.1590/0103-6440201302188. Acesso em: 14 set. 2026.

LIMA, F. S. F. de; FACURY, A. G. B. F. *Enterococcus faecalis* and endodontic treatment failure: a qualitative systematic review of its role and elimination strategies. **Australian Endodontic Journal**, v. 52, n. 2, p. 585–605, 2026. DOI: 10.1111/aej.70072. Disponível em: https://doi.org/10.1111/aej.70072. Acesso em: 14 set. 2026.

MELHORANÇA FILHO, A. L.; PEREIRA, M. R. R. Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 598–603, 2012. Disponível em: https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13663. Acesso em: 14 set. 2026.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Resistência antimicrobiana**. Washington, DC: OPAS, [s. d.]. Disponível em: https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana. Acesso em: 15 set. 2026.

PAES, A. S. et al. Potencial antioxidante de plantas da Amazônia: uma revisão integrativa. **Revista Contexto & Saúde**, v. 25, n. 50, e15659, 2025. DOI: 10.21527/2176-7114.2025.50.15659. Disponível em: https://doi.org/10.21527/2176-7114.2025.50.15659. Acesso em: 14 set. 2026.

PENNA FELISBERTO, L. et al. Antimicrobial efficacy and dentinal tubule penetration of the photosensitizer acai (*Euterpe oleracea* Martius): a new approach in antimicrobial photodynamic therapy in endodontics. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 43, n. 8, p. 363–372, 2025. DOI: 10.1089/photob.2024.0147. Disponível em: https://doi.org/10.1089/photob.2024.0147. Acesso em: 14 set. 2026.

PINHEIRO, J. S. **Procianidinas bioativas da semente de açaí: estudo da atividade antimicrobiana**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2025. 1 vídeo. Trabalho apresentado no Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UFSC. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/268237. Acesso em: 15 set. 2026.

RODRIGUES, J. et al. Potencial antimicrobiano de extratos vegetais com foco na odontologia. **RECIMA21 – Revista Científica Multidisciplinar**, v. 5, e5115843, 2024. DOI: 10.47820/recima21.v5i11.5843. Disponível em: https://doi.org/10.47820/recima21.v5i11.5843. Acesso em: 14 set. 2026.

SCHAUSS, A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604–8610, 2006. DOI: 10.1021/jf0609779. Disponível em: https://doi.org/10.1021/jf0609779. Acesso em: 14 set. 2026.

SILVA, A. P. de Souza et al. Phenolic profile and the antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of açaí (*Euterpe oleracea*) meal: a prospective study. **Foods**, v. 12, art. 86, 2023. DOI: 10.3390/foods12010086. Disponível em: https://doi.org/10.3390/foods12010086. Acesso em: 14 set. 2026.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F. et al. Apical root canal microbiome associated with primary and posttreatment apical periodontitis: a systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 57, n. 8, p. 1043–1058, 2024. DOI: 10.1111/iej.14071. Disponível em: https://doi.org/10.1111/iej.14071. Acesso em: 14 set. 2026.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6. Acesso em: 14 set. 2026.

YAMAGUCHI, K. K. et al. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055. Acesso em: 14 set. 2026.

YANG, S. et al. Strategies and mechanisms targeting *Enterococcus faecalis* biofilms associated with endodontic infections: a comprehensive review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, art. 1433313, 2024. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1433313. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1433313. Acesso em: 14 set. 2026.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 5, p. 389–398, 2006. DOI: 10.1016/j.joen.2005.09.014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.014. Acesso em: 14 set. 2026.

APÊNDICE A – SUBMISSÃO À REVISTA E ARTIGO

International Journal of Dentistry

Research Article

Therapeutic potential of acai extracts in the antimicrobial control of Enterococcus faecalis

Submission ID 87c67c18-1ba0-48cf-8d0d-b11a0bf3ee0f

Submission Version Initial Submission

PDF Generation 14 Jul 2026 15:57:24 EST by Atypon ReX

Authors

Dr. Fábio Alessandro Pieri

ORCiD
https://orcid.org/0000-0002-2467-0039

Affiliations
- Institute of Life Sciences, Graduate Program in Health Applied Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Advanced Campus Governador Valadares, Brazil

Mr. Caio Augusto Freitas Martins
Corresponding Author
Submitting Author

Affiliations
- Institute of Life Sciences, Graduate Program in Health Applied Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Advanced Campus Governador Valadares, Brazil

Files for peer review

All files submitted by the author for peer review are listed below. Files that could not be converted to PDF are indicated; reviewers are able to access them online.

Name	Type of File	Size	Page
Artigo Caio.docx	Main Document - MS Word	9.6 MB	Page 3

Antimicrobial assessment of methanolic açaí epicarp extract against *Enterococcus faecalis*

Authors: Fábio Alessandro Pieri*, Caio Augusto Freitas Martins

Affiliation: Institute of Life Sciences, Graduate Program in Health Applied Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Advanced Campus Governador Valadares, Brazil.

Full Institutional Postal Addresses: Avenida Moacir Paleta, 1167 – São Pedro, Governador Valadares, Minas Gerais, CEP 35020-360, Brazil.

Emails: [fabio.pieri@ufjf.br], [caioaugustofm@hotmail.com]

***Corresponding author**

Abstract

Background: *Enterococcus faecalis* is associated with persistent endodontic infections. Açaí (*Euterpe oleracea*) contains chemically diverse fractions that require preparation-specific antimicrobial assessment.
Objective: To evaluate methanolic *Euterpe oleracea* epicarp extract against *Enterococcus faecalis* by Minimum Inhibitory Concentration, longitudinal bacterial counts, and a crystal violet adhesion assay.
Methods: The extract was assessed by broth microdilution, longitudinal plate counts over 24 h, and a crystal violet adhesion assay. The longitudinal design comprised four independent experiments per concentration for nine concentrations (36 combinations), each with three technical replicates measured at six time points (up to 648 planned readings). The available observations were analyzed using a linear mixed model with a random intercept and first-order autoregressive correlation. Concentration was modeled as a factor, time by linear and quadratic terms, and pairwise comparisons at each time were adjusted by Holm's method. The adhesion dataset comprised 828 independent readings analyzed by Type III factorial ANOVA, HC3 robust sensitivity tests, and Tukey-Kramer comparisons.
Results: The MIC was > 20 mg/mL. Concentration had no overall effect on longitudinal counts ($p = 0.9936$), whereas linear and quadratic time terms and experiment were significant. Concentration-by-time interactions remained above 0.05. Holm-adjusted comparisons showed lower estimated means at 1 mg/mL in selected intervals from 3 to 12 h, but no concentration differences at 0, 2, or 24 h. The pattern was not monotonic. In the crystal violet assay, group, concentration, and group-by-concentration interaction were significant (all $p < 0.0001$) and remained significant with HC3 correction. At 20 mg/mL, test-group absorbance was 1.751 units above the negative control. Pigmentation, precipitation, non-normal residuals, and variance heterogeneity prevented attribution of this signal solely to bacterial biomass.
Conclusions: Under the tested conditions, crude methanolic *Euterpe oleracea* epicarp extract did not show a concentration-dependent antimicrobial effect against *Enterococcus faecalis*. The transient finding at 1 mg/mL is exploratory. Further studies should use extract-only optical blanks, independent viability measurements, predefined counting limits, and chemically characterized fruit fractions.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; Endodontics; *Euterpe oleracea*; Natural products; Linear mixed model.

Introduction

Persistent and secondary endodontic infections are difficult to eliminate because microorganisms can remain in anatomical irregularities, dentinal tubules, and biofilms. *Enterococcus faecalis* is frequently investigated in this context because it tolerates nutrient limitation, alkaline stress, and other adverse conditions [1-4].

Sodium hypochlorite and chlorhexidine are established endodontic antimicrobials, but each has limitations. Sodium hypochlorite dissolves organic tissue and has broad antimicrobial activity but may damage tissues after extrusion, whereas chlorhexidine has substantivity but does not dissolve organic tissue. These limitations support the investigation of complementary agents without diminishing the role of current protocols [5,6].

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) contains anthocyanins, flavonoids, procyanidins, lipids, and other constituents whose distribution varies among epicarp, pulp, and seed and according to extraction conditions [7]. Results obtained with seed oil, pulp-derived preparations, or photosensitizing formulations cannot be assumed to apply to crude methanolic epicarp extract [8-10].

This study evaluated crude methanolic açaí epicarp extract against *Enterococcus faecalis* by broth microdilution, longitudinal viable counts, and a crystal violet adhesion assay. The study was designed to delimit the activity of the tested preparation and to distinguish concentration-related effects from time and experimental variability.

Materials and methods

Natural extract: A methanolic extract of the açaí epicarp (fruit peel; *Euterpe oleracea* Mart.) was provided by Professor Klenicy Kazumi Yamaguchi de Lima, Institute of Health and Biotechnology, Federal University of Amazonas, Coari, Brazil. Collection, voucher, extraction yield, and pre-study storage details were not available in the records supplied for this work and were not inferred.

Bacterial Strain Preparation The *E. faecalis* (ATCC 29212) strain was acquired from culture banks. The strain was cultured in BHI (Brain Heart Infusion) broth and maintained under ideal growth conditions at 37°C under aerobic conditions. Culture media were prepared following the manufacturers' recommendations and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Bacterial cultures were handled with a sterile bacteriological loop used for inoculation in Petri dishes. The inoculated plates were placed in bacteriological incubators at 37°C under aerobic conditions.

After a 24-hour period, the plates were visually examined. Pure colonies, originating from a single bacterial strain, were selected and marked for subsequent subculture, ensuring the maintenance of viability and purity throughout the study. The entire procedure was performed under strictly aseptic conditions.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC): The broth microdilution method was performed with adaptations from CLSI M07-A10 [11]. A stock solution of the extract was prepared in methanol. The nominal concentrations evaluated were 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125, and 0.0625 mg/mL; they were prepared from the methanolic stock solution in BHI using sterile 96-well plates. The wells were inoculated to a final concentration of approximately 5×10^5 CFU/mL and a final volume of 125 µL, then incubated at 37 °C for 24 h.

The MIC was defined as the lowest concentration without a resazurin color change compatible with bacterial growth. Each plate included a positive growth control, a negative sterility control, and a vehicle control containing the same methanol proportion used in the treatments. The assay was performed in three independent experiments, with technical replicate wells on each plate.

Microbial count over time: Standardized cultures (approximately 5×10^5 CFU/mL) were exposed to 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, or 20 mg/mL extract in BHI at 37 °C. Samples of 10 µL were collected at 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h, subjected to the dilutions recorded in the dataset, plated on BHI agar, and incubated for 24 h before counting. A positive growth control was followed in parallel. Each independent experiment included three technical replicates. All nine concentrations were evaluated in four independent experiments each (n = 4), yielding 36 concentration-by-experiment combinations. Each combination included three technical replicates sampled at six time points, corresponding to a maximum of 648 planned readings if all scheduled counts were obtained.

Adhesion assay: The assay was adapted from Stepanović et al. [12]. Bacterial suspension (25 µL; approximately 5×10^5 CFU/mL) and diluted extract (100 µL) were incubated in 96-well plates at 37 °C for 24 h. The positive control contained 25 µL bacterial suspension and 100 µL autoclaved distilled water; the vehicle control contained 10 µL methanol, 90 µL BHI, and 25 µL bacterial suspension; the negative control contained sterile BHI without inoculum. After incubation, the plates were washed three times with distilled water and air-dried. Retained material was fixed with 250 µL methanol for 15 min, stained with crystal violet for 10 min, washed, dried, solubilized with 250 µL 33% glacial acetic acid, and read at 540 nm. Because the extract was pigmented and formed visible precipitates, absorbance was not assumed to represent bacterial biomass alone. The assay was performed in three independent experiments, with technical replicates according to the plate design.

Statistical analysis: Counts classified as too numerous to count were coded at the operational ceiling of 300 colonies before conversion to CFU/mL. Values were transformed as log10(CFU/mL + 1). The intended four-experiment design yields 36 independent concentration-by-experiment combinations, 108 technical replicate trajectories, and up to 648 scheduled readings over six times. The recorded analysis used 774 observations grouped under 125 analytical unit identifiers. The correspondence of these identifiers to independent experiments and technical replicates requires verification before refitting the model. A linear mixed model with a random intercept and an AR(1) within-unit correlation structure was used. Fixed terms included concentration, linear and quadratic time, experiment, and concentration-by-time interactions. Degrees of freedom used the containment method. Estimated marginal means were compared among concentrations within each time point with Holm adjustment for 36 comparisons. For the adhesion assay, all 828 readings in the final dataset were retained as independent observations without aggregation or deletion as duplicates. Absorbance was analyzed by Type III factorial ANOVA with group, concentration, and their interaction. Residual normality was examined with Shapiro-Wilk and variance homogeneity with Fligner-Killeen. Because both assumptions were violated, an HC3 robust sensitivity analysis was performed. Tukey comparisons were used among concentrations in the test group, and Tukey-Kramer comparisons were used among groups within each concentration. The significance level was 0.05. Analyses were performed in jamovi 2.7 and R 4.5.

Quality control: The MIC assay was performed in three independent experiments. For the longitudinal assay, every independent experiment contained three technical replicates; all nine concentrations were evaluated in four independent experiments each, as specified above (36 independent concentration-by-experiment combinations and 108 technical replicate series). Technical replicates, serial bacterial dilutions, and repeated time measurements were not treated as independent experimental units in the longitudinal analysis. The adhesion assay

was performed in three experiments with the readings specified by the plate design; all 828 readings were retained as independent observations in its final analysis dataset. Assay-appropriate positive, negative, and vehicle controls were included.

Use of artificial intelligence: Artificial intelligence tools supported information organization, language revision, translation, and preliminary code structure. Model selection, data checking, interpretation, and approval remained the responsibility of the researcher and supervisor. Definitive statistical results were obtained in jamovi and R.

Results

The control wells supported interpretation of the microdilution assay. Metabolic activity was observed at every concentration from 0.0625 to 20 mg/mL; therefore, the MIC was > 20 mg/mL.

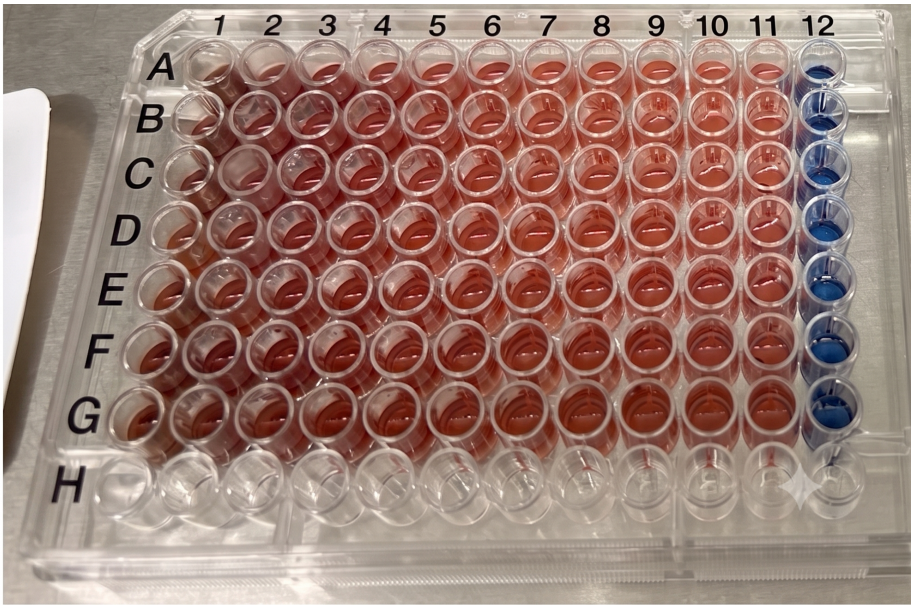


Figure 1 - Broth microdilution assay of methanolic Euterpe oleracea epicarp extract in a 96-well plate. Columns 1-9 contain, respectively, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125, and 0.0625 mg/mL; column 10 is the methanol vehicle control, column 11 the positive growth control, and column 12 the negative sterility control. Rows A-G show filled wells, whereas row H appears without visible assay reagents. Resazurin color compatible with metabolic activity at every tested concentration established MIC > 20 mg/mL.

No concentration within the tested range produced visually detectable inhibition after 24 h. The MIC was not reached, and no value above 20 mg/mL was estimated.

The mixed model showed no overall concentration effect ($p = 0.9936$). Linear and quadratic time terms and experiment were significant ($p < 0.05$), whereas concentration-by-time interactions remained above 0.05. Holm-adjusted comparisons showed no concentration differences at 0, 2, or 24 h. Estimated means at 1 mg/mL were lower than selected concentrations at 4, 8, and 12 h in the original model comparisons. Because this was a non-monotonic, time-specific pattern without a significant overall concentration effect, it was treated as exploratory.

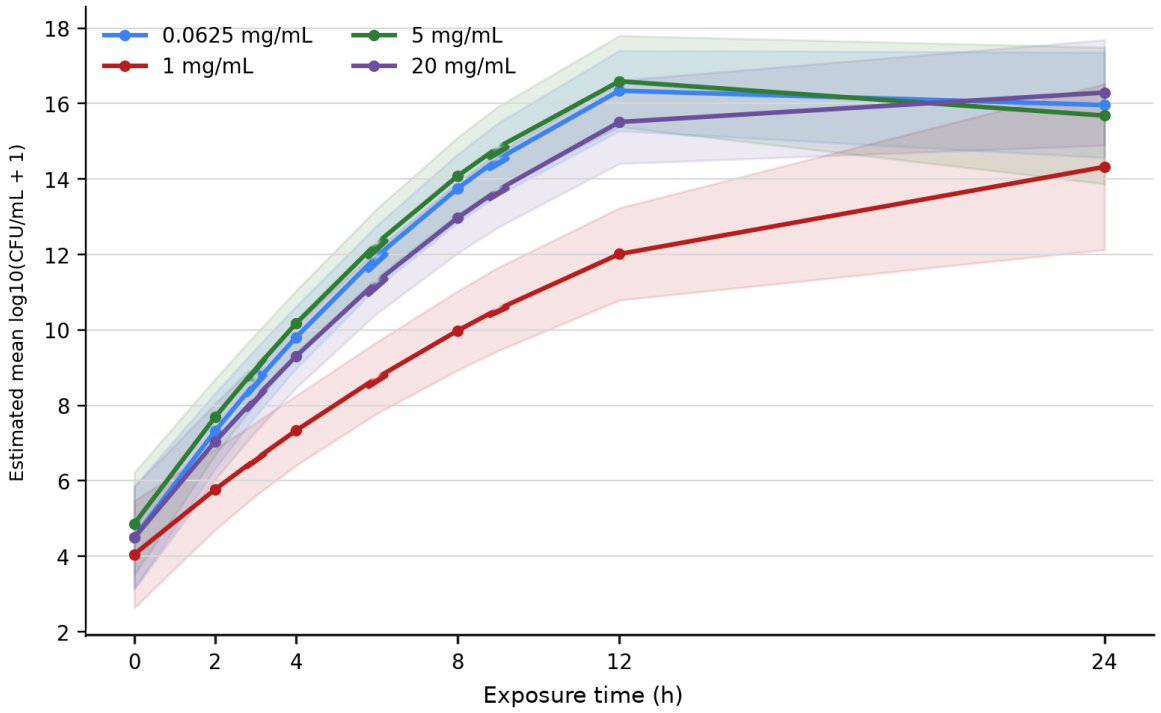


Figure 2 - Estimated marginal means of log10(CFU/mL + 1) at 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h for representative concentrations selected to avoid line overlap. Shaded bands indicate 95% confidence intervals based on model standard errors.

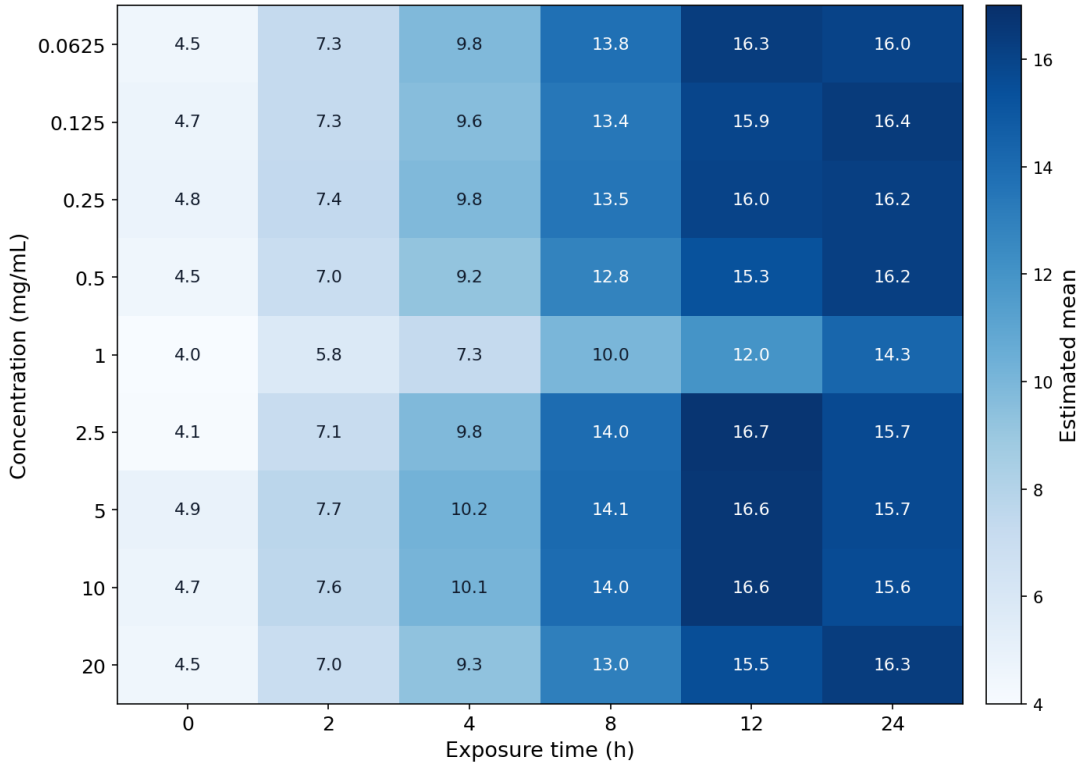


Figure 3 - Heatmap of estimated marginal means for all nine concentrations at 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h. The lower values at 1 mg/mL during intermediate times do not form a monotonic concentration-response gradient.

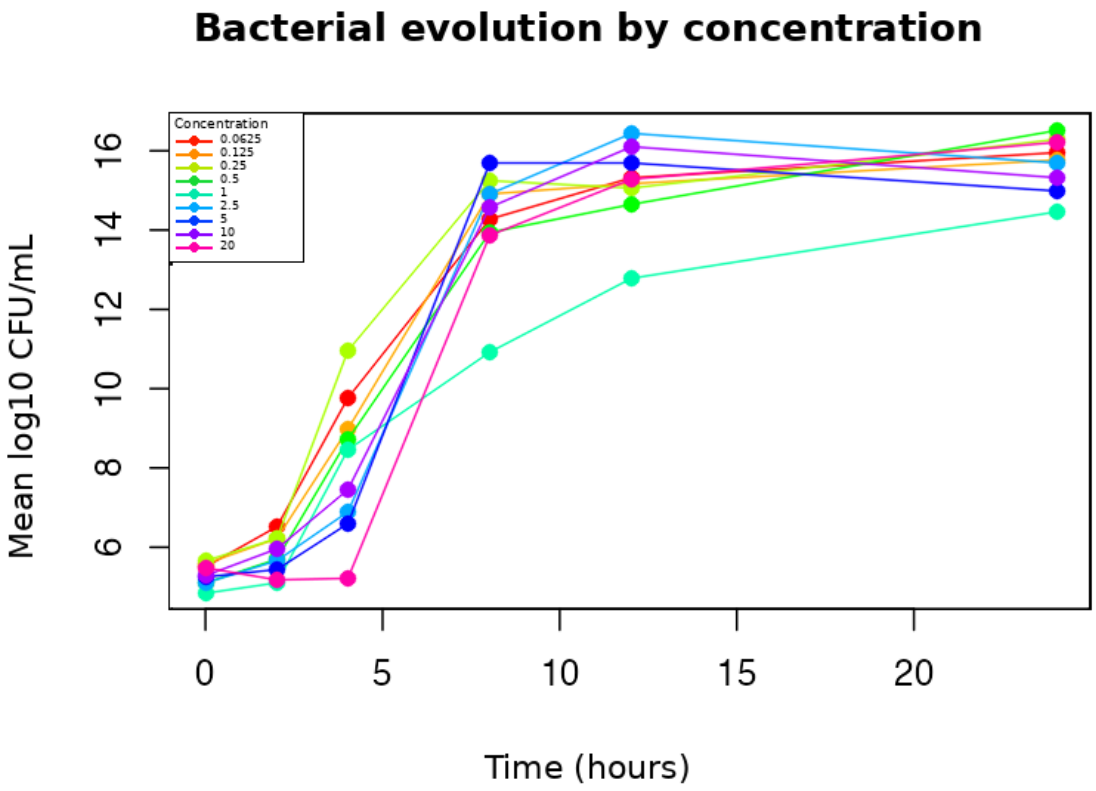


Figure 4 - Descriptive evolution of mean log10(CFU/mL) at 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h by concentration. Lines connect observed means and are presented for visualization only; inferential conclusions were based on the linear mixed model, which showed no overall concentration effect.

The adhesion dataset comprised 828 absorbance readings: 27 per concentration in the test group, 18 per concentration in the positive control + methanol group, and 24 per concentration in the negative control group. The distribution of the optical signal by group and concentration is shown in Figure 5. Test-group means ranged from 0.210 ± 0.061 at 0.019 mg/mL to 1.839 ± 0.821 at 20 mg/mL (Table 1).

Type III factorial ANOVA showed effects of group, $F(2, 792) = 375.91$, $p < 0.0001$, partial $\eta^2 = 0.487$; concentration, $F(11, 792) = 41.54$, $p < 0.0001$, partial $\eta^2 = 0.366$; and group-by-concentration interaction, $F(22, 792) = 43.90$, $p < 0.0001$, partial $\eta^2 = 0.549$. Model R^2 was 0.749 (adjusted $R^2 = 0.738$).

Residuals were non-normal (Shapiro-Wilk $W = 0.48$, $p < 0.0001$), and variances differed across the 36 cells (Fligner-Killeen $\chi^2(35) = 223$, $p < 0.0001$). In the HC3 robust sensitivity analysis, group, $F(2, 792) = 465.81$; concentration, $F(11, 792) = 39.26$; and interaction, $F(22, 792) = 21.59$, remained significant (all $p < 0.0001$).

Tukey-Kramer comparisons showed higher absorbance in the test group than in the negative control at 0.009 mg/mL and from 0.039 to 20 mg/mL (adjusted $p < 0.05$); the 0.019 mg/mL contrast did not reach significance ($p = 0.055$). At 20 mg/mL, the test-minus-negative-control difference was 1.751 absorbance units (95% CI 1.619-1.882; adjusted $p < 0.0001$). The test group also exceeded the positive control + methanol group from 0.625 to 20 mg/mL, whereas the two controls did not differ at any concentration. Visible pigmentation and precipitation prevented attribution of these optical differences solely to adhesion or biofilm biomass.

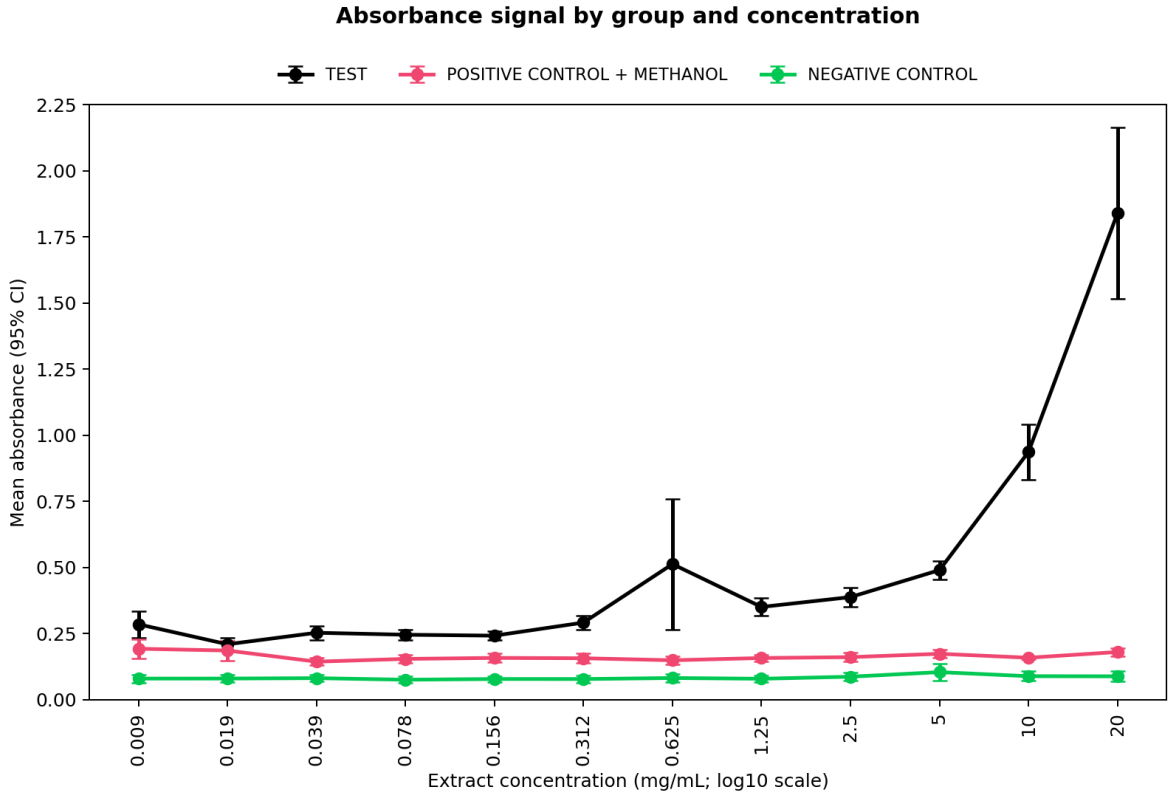


Figure 5 - Mean absorbance signal by group and extract concentration. Points are means and error bars are 95% confidence intervals. The increase in the test-group optical signal cannot be attributed exclusively to biomass or adhesion because pigment and precipitated material were observed.

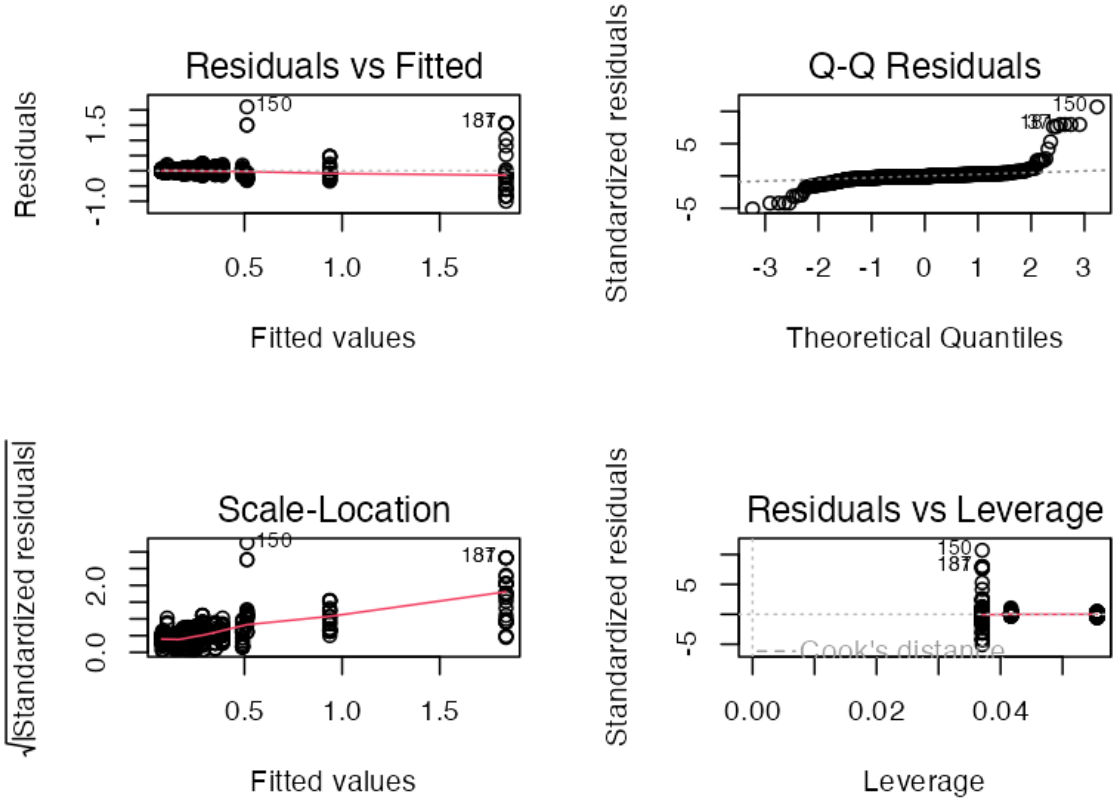


Figure 6 - Diagnostic plots for the factorial ANOVA of the adhesion assay. Residual, Q-Q, scale-location, and leverage plots indicate non-normality and heteroscedasticity, supporting the HC3 robust sensitivity analysis.

Table 1. Crystal violet absorbance by group and concentration.

Concentration (mg/mL)	Test (n = 27)	Positive control + methanol (n = 18)	Negative control (n = 24)
0.009	0.285 ± 0.126	0.193 ± 0.073	0.080 ± 0.037
0.019	0.210 ± 0.061	0.186 ± 0.075	0.080 ± 0.032
0.039	0.253 ± 0.068	0.144 ± 0.029	0.082 ± 0.030
0.078	0.246 ± 0.050	0.154 ± 0.031	0.076 ± 0.030
0.156	0.242 ± 0.043	0.158 ± 0.034	0.078 ± 0.027
0.312	0.292 ± 0.068	0.157 ± 0.038	0.078 ± 0.034
0.625	0.513 ± 0.624	0.149 ± 0.029	0.082 ± 0.037
1.250	0.351 ± 0.084	0.158 ± 0.027	0.079 ± 0.032
2.500	0.388 ± 0.090	0.161 ± 0.033	0.087 ± 0.038
5.000	0.490 ± 0.086	0.174 ± 0.031	0.104 ± 0.073
10.000	0.937 ± 0.264	0.159 ± 0.010	0.089 ± 0.043
20.000	1.839 ± 0.821	0.181 ± 0.030	0.089 ± 0.047

Values are mean ± standard deviation. Each concentration included 27 test-group readings, 18 positive control + methanol readings, and 24 negative-control readings.

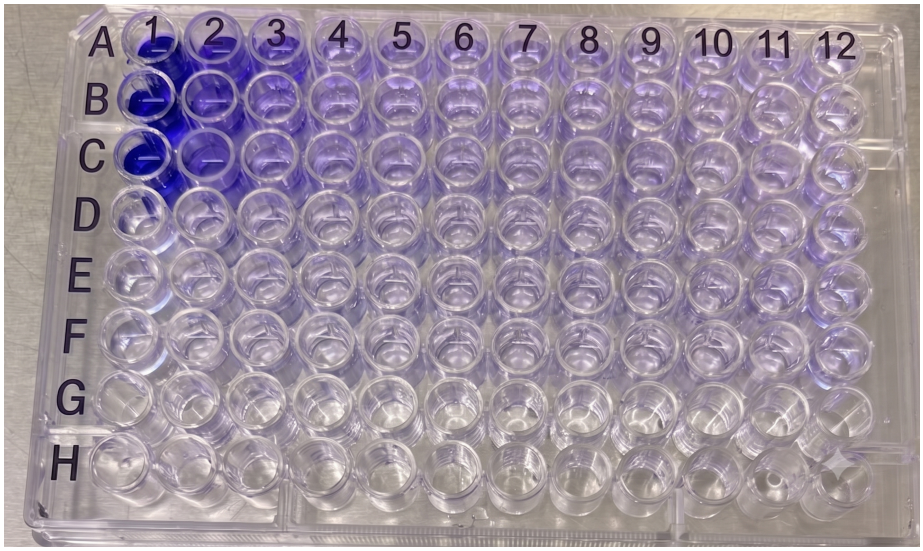


Figure 7 - Macroscopic appearance of the crystal violet plate. Stronger pigmentation and precipitated material at higher extract concentrations indicate potential physicochemical interference with optical readings.

Discussion

The MIC result is the clearest efficacy finding: crude methanolic epicarp extract did not inhibit *E. faecalis* within the tested range. This outcome cannot be directly compared with studies of açaí seed oil, pulp-derived preparations, or photosensitizers because plant fraction, extraction, formulation, and activation conditions differ. Penna Felisberto et al. [8] evaluated açaí as a photosensitizer in an endodontic model, whereas the present study tested non-photoactivated crude epicarp extract.

The longitudinal model did not support a general concentration effect. Time and experiment contributed to variation, and counts increased over the study period. The lower estimated means at 1 mg/mL between 3 and 12 h were limited to specific Holm-adjusted contrasts, were absent at 24 h, and did not extend into a monotonic concentration-response pattern. They should therefore be replicated before a biological mechanism is proposed.

Two measurement limitations qualify the findings. First, coding plates above the countable range as 300 colonies compressed high values and treated a lower bound as an exact number. Second, the crystal violet assay showed large group, concentration, and interaction effects, with the highest signal in the test group at 20 mg/mL. These effects remained significant with HC3 correction, indicating that the optical differences were not explained solely by variance heterogeneity. Nevertheless, the assay retained optical material from a pigmented, precipitating extract, and the maximum test-control difference occurred under the condition with the greatest visible pigment and precipitate. The method therefore did not distinguish bacterial biomass from physicochemical interference [13]. Non-normal residuals and heterogeneous variances further require caution in interpreting conventional parametric and post hoc estimates.

Future experiments should include extract-only blanks for every concentration, independent viable-count or microscopy endpoints, predefined dilution rules that minimize uncountable plates, and chemical characterization of the tested fraction. Parallel evaluation of epicarp, pulp, seeds, and seed oil may determine whether another *E. oleracea* fraction has reproducible activity against *E. faecalis*.

Conclusion

Crude methanolic *Euterpe oleracea* epicarp extract did not inhibit *Enterococcus faecalis* at 0.0625-20 mg/mL and showed no overall concentration effect in the longitudinal mixed model ($p = 0.9936$). The time-specific finding at 1 mg/mL was exploratory and did not establish dose-dependent, bactericidal, or sustained bacteriostatic activity.

In the crystal violet assay, group, concentration, and their interaction significantly affected absorbance, and the test-minus-negative-control difference reached 1.751 units at 20 mg/mL. These findings demonstrate an optical signal increase but do not establish increased adhesion or biofilm because extract pigmentation and precipitation may have contributed to absorbance. The overall findings do not support endodontic use of the tested preparation; they define the conditions and controls required for more conclusive studies of other açaí fractions.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Funding statement

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

1. Elashiry MM, Bergeron BE, Tay FR. *Enterococcus faecalis* in secondary apical periodontitis: mechanisms of bacterial survival and disease persistence. Microb Pathog. 2023;183:106337. doi:10.1016/j.micpath.2023.106337.
2. Barbosa-Ribeiro M, Gomes BPFA, Arruda-Vasconcelos R, Monteiro IA, Costa MJF, Sette-de-Souza PH. Antibiotic resistance profile of clinical strains of enterococci from secondary/persistent endodontic infections: what do we know? A systematic review of clinical studies. J Endod. 2024;50(3):299-309. doi:10.1016/j.joen.2023.12.007.
3. Siqueira Junior JF, Rôças IN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Apical root canal microbiome associated with primary and posttreatment apical periodontitis: a systematic review. Int Endod J. 2024;57(8):1043-1058. doi:10.1111/iej.14071.
4. Yang S, Meng X, Zhen Y, et al. Strategies and mechanisms targeting *Enterococcus faecalis* biofilms associated with endodontic infections: a comprehensive review. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1433313. doi:10.3389/fcimb.2024.1433313.
5. Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in endodontics. Braz Dent J. 2013;24(2):89-102. doi:10.1590/0103-6440201302188.
6. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32(5):389-398. doi:10.1016/j.joen.2005.09.014.
7. Yamaguchi KK, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. Food Chem. 2015;179:137-151. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.055.
8. Penna Felisberto L, Chompanidis MMCM, De Martin AS, Fontana CE, Stringheta CP, Baptista JS, et al. Antimicrobial efficacy and dentinal tubule penetration of the photosensitizer acai (*Euterpe oleracea* Martius): a new approach in antimicrobial photodynamic therapy in endodontics. Photobiomodul Photomed Laser Surg. 2025;43(8):363-372. doi:10.1089/photob.2024.0147.

9. Melhorança Filho AL, Pereira MRR. Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Biosci J. 2012;28(4):598-603.

10. de Souza Silva AP, de Camargo AC, Lazarini JG, Franchin M, Sardi JCO, Rosalen PL, et al. Phenolic profile and the antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of açaí (*Euterpe oleracea*) meal: a prospective study. Foods. 2023;12(1):86. doi:10.3390/foods12010086.

11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 10th ed. CLSI standard M07-A10. Wayne, PA: CLSI; 2015.

12. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000;40(2):175-179. doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

13. Almutary A, Sanderson BJ. The MTT and crystal violet assays: potential confounders in nanoparticle toxicity testing. Int J Toxicol. 2016;35(4):454-462. doi:10.1177/1091581816648906.

International Journal of
Dentistry

Research Article

Therapeutic potential of acai extracts in the antimicrobial control of Enterococcus faecalis

Submission ID 87c67c18-1ba0-48cf-8d0d-b11a0bf3ee0f

Submission Version Initial Submission

PDF Generation 14 Jul 2026 15:57:24 EST by Atypon ReX

Authors

Dr. Fábio Alessandro Pieri

ORCiD
https://orcid.org/0000-0002-2467-0039

Affiliations

- Institute of Life Sciences, Graduate Program in Health Applied Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Advanced Campus Governador Valadares, Brazil

Mr. Caio Augusto Freitas Martins
Corresponding Author
Submitting Author

Affiliations

- Institute of Life Sciences, Graduate Program in Health Applied Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Advanced Campus Governador Valadares, Brazil