

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ISAURA FREITAS TEIXEIRA DE ARGÔLO

**Avaliação do sinergismo entre os componentes da pasta CTZ e o
citronelol frente ao *Enterococcus faecalis***

**João Pessoa
2014**

ISAURA FREITAS TEIXEIRA DE ARGÔLO

Avaliação do sinergismo entre os componentes da pasta CTZ e o citronelol frente ao *Enterococcus faecalis*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para conclusão.

Orientadora: Simone Alves de Sousa

**João Pessoa
2014**

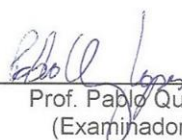
ISAURA FREITAS TEIXEIRA DE ARGÔLO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia, da Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento às
exigências para conclusão.

Monografia aprovada em 29 / 08 / 14



Prof.^a Simone Alves de Sousa
(Orientadora – UFPB)



Prof. Pablo Queiroz Lopes
(Examinador – UFPB)



Prof.^a Eliane Batista de Medeiros Serpa
(Examinadora – UFPB)

Prof. Ricardo Cavalcanti Duarte
(Examinador – UFPB)

A693a Argôlo, Isaura Freitas Teixeira de.

Avaliação do sinergismo entre os componentes da pasta
CTZ e o citronelol frente ao enterococcus faecalis / Isaura Freitas
Teixeira de Argôlo - João Pessoa: [s.n.], 2014.
33f. : il.

Orientadora: Simone Alves de Sousa.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Odontopediatria.
2. Microbiologia.
3. . Citronelol.

BS/CCS/UFPB

CDU:

DEDICATÓRIA

AO MEU PAI, HERVAL COELHO TEIXEIRA NETO (In Memoriam).

Dedico-te esta conquista, pois, mesmo não partilhando esse momento junto a mim, estás ufano e vibrando por esta vitória. Agradeço por todos os ensinamentos e valores passados. Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar e guiar meu caminho, transmitindo forças para superar as dificuldades e bênçãos para as minhas conquistas.

À minha mãe Roselene Freitas Barros Teixeira, minha heroína, por me apoiar, fortalecer e incentivar nas horas difíceis. Obrigada por todo amor e carinho dedicado a mim e por compartilhar mais esse sonho comigo.

Aos meus irmãos, Felipe, Amanda e Herval pela força, coragem e incentivo. Obrigada por acreditarem na minha dedicação!

À toda minha família que sempre me apoiou e me incentivou nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

À minha orientadora Simone Alves de Sousa a quem tenho grande orgulho e admiração. Agradeço pelo suporte, incentivo, paciência e carinho durante toda essa jornada.

À Eliane Batista, Pablo Queiroz e Ricardo Duarte pelo paciente trabalho de leitura do trabalho. Aos demais professores, sou grata pela dedicação e ensinamentos transmitidos durante todo o curso.

A minha companheira de projeto, Louise Bezerra, pela paciência, dedicação, incentivo e experiências transmitidas. Obrigada, sem você nada disso teria sido possível!

Aos amigos que fizeram parte da minha formação e compartilharam esse sonho em conjunto. Meus agradecimentos especiais à Larissa Amaral, Thaiany Costa, Evelyn Thais e Olivia Vieira pelo companheirismo e amizade consolidada durante todo esse tempo. Nossos momentos de risos e estresses serão sempre recordados com muito carinho. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Aos pacientes da Clínica de Odontologia da UFPB, pela colaboração e confiança em nossos tratamentos, conseqüentemente para o nosso aprimoramento também.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a interação medicamentosa entre os componentes da pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol) e o fitoconstituente citronelol frente ao *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O teste *checkerboard* foi realizado para analisar o sinergismo entre as substâncias, através do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Para isto, considerando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, foram preparadas 7 soluções de cada componente pesquisado com os valores: CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8, CIMX2, CIMX4, CIMX8. Além disso, foram realizados controle de viabilidade da cepa e de esterilidade do meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados visualmente, considerando a formação ou não de aglomerados de células no fundo dos poços das placas de microdiluição. Para asseverar a presença de micro-organismos viáveis nas concentrações não inibitórias, empregou-se o corante TCT 0,5% (2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio), o qual reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular. Os resultados do teste *checkerboard* mostraram: aditividade entre a tetraciclina e o cloranfenicol (ICIF: 0,625), indiferença entre tetraciclina e eugenol (ICIF: 1,125), aditividade entre tetraciclina e citronelol (ICIF: 0,75), indiferença entre cloranfenicol e eugenol (ICIF: 1,5), aditividade entre cloranfenicol e citronelol (ICIF: 0,625) e sinergismo entre eugenol e citronelol (ICIF: 0,5). Concluiu-se que todas as combinações apresentaram uma interação medicamentosa positiva, possibilitando suas associações ou substituições sem prejuízo da capacidade antibacteriana.

Palavras-chave: Pastas obturadoras; citronelol; Odontopediatria; Microbiologia; Testes de Sensibilidade Microbiana.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the drug interaction between components of CTZ paste (chloramphenicol, tetracycline, zinc oxide and eugenol) and citronellol phytochemical against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The *checkerboard* test was performed to verify the interaction between substances, through the Fractional Inhibitory Concentration Index (IFIC). For this purpose, considering the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth, 7 solutions were prepared of each component searched with the values: MIC, MIC/2, MIC/4, MIC/8, MICX2, MICX4, MICX8. Furthermore, control of the strain viability and sterility of the culture medium were performed. Assays were performed in triplicate and results were visually evaluated, considering whether or not the formation of clusters of cells at the bottom of the wells of microdilution plates. To assure the presence of viable micro-organisms on non-inhibitory concentrations, we used the pigment TCT 0.5% (2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride), which reflects the activity of dehydrogenase enzymes, involved in the process of cellular respiration. After the *checkerboard* test, some results were verified as well as: additivity between tetracycline and chloramphenicol (IFIC: 0.625), indifference between tetracycline and eugenol (IFIC: 1.125), additivity between tetracycline and citronellol (IFIC: 0.75), indifference between chloramphenicol and eugenol (IFIC: 1.5), additivity between chloramphenicol and citronellol (IFIC: 0.625) and synergism between eugenol and citronellol (IFIC: 0.5). It was concluded that all combinations showed a positive drug interaction, enabling their associations or replacements without prejudice the antibacterial ability.

Key words: Endodontic pastes; Citronellol; Pediatric Dentistry; Microbiology; Microbial Sensitivity Tests.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma (s)

µL – Microlitro (s)

ATCC - American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO - Dimetil sulfóxido

g – Grama (s)

h- Hora (s)

IFIC - Índice de Concentração Inibitória Fracionada

MHA - Agar Müller Hinton

mL – Mililitro (s)

mm – Milímetros (m)

NUMETROP – Núcleo de Medicina Tropical

TCT - 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio

UFC – Unidade Formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema de preparação dos inóculos bacterianos de acordo com as normas do CLSI.....32
- Figura 2: Esquema do ensaio do sinergismo pelo método *checkerboard*.....35

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Materiais utilizados para realização da pesquisa.....29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Valores das concentrações das soluções-mães, em µg/ml, para tetraciclina, cloranfenicol, eugenol, citronelol.....33
- Tabela 2: Valores da CIM, em µg/ml, para tetraciclina, cloranfenicol, eugenol e citronelol frente a cepas de *Enterococcus faecalis*.....34
- Tabela 3: Interpretação dos valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada..... 35
- Tabela 4: Valores do índice ICIF e interpretação dos resultados.....38

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 2.1 <u>Micro-organismos presentes em infecções endodônticas</u> | 14 |
| 2.2 <u>Enterococcus faecalis</u> | 15 |
| 2.3 <u>Pastas obturadoras de canais radiculares</u> | 17 |
| 2.4 <u>Pasta obturadora CTZ</u> | 18 |
| 2.4.1 Cloranfenicol..... | 21 |
| 2.4.2 Tetraciclina..... | 22 |
| 2.4.3 Óxido de zinco e eugenol (OZE)..... | 22 |
| 2.5 <u>Fitoterapia e Óleo essencial</u> | 24 |
| 2.5.1 Citronelol..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 <u>Objetivo geral</u> | 28 |
| 3.2 <u>Objetivos específicos</u> | 28 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 <u>Delineamento do estudo</u> | 29 |
| 4.2 <u>Locais de realização da pesquisa</u> | 29 |
| 4.3 <u>Materiais utilizados na pesquisa</u> | 29 |
| 4.4 <u>Cepas Bacterianas</u> | 30 |
| 4.4.1 Reativação..... | 30 |
| 4.4.2 Ajuste dos inóculos para realização dos ensaios..... | 30 |
| 4.4.3 Diluição do inóculo..... | 31 |
| 4.5 <u>Preparo das substâncias</u> | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6 <u>Ensaio de sinergismo – método <i>checkerboard</i></u> | 34 |
| 4.7 <u>Análise de dados</u> | 36 |
| 5. RESULTADOS | 37 |
| 6. DISCUSSÃO | 39 |
| 7. CONCLUSÃO | 43 |
| 8. REFERÊNCIAS | 44 |

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal apresenta uma pluralidade de micro-organismos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários. Algumas bactérias possuem a capacidade de formar biofilmes, os quais proporcionam uma oportunidade ideal para o crescimento e sobrevivência desses micro-organismos (MARSH; MARTIN, 2005). Dentre essas bactérias, o *Enterococcus faecalis* expressa um papel relevante nas infecções endodônticas por apresentar importantes fatores de virulência, aderência ao colágeno dentinário, sobrevivência em ambientes críticos e resistência à terapia endodôntica (ESTRELA *et al.*, 2010).

Há uma grande divergência a respeito da técnica endodôntica preconizada para dentes decíduos, posto que a complexa anatomia interna dos sistemas de canais radiculares dificulta o acesso e instrumentação desses dentes. A falta de um protocolo para o tratamento desses dentes resulta em condutas subjetivas e diversificadas por parte dos profissionais, sendo estes, muitas vezes, influenciados pelas próprias predileções e destrezas. Assim, faz-se imprescindível a utilização de materiais obturadores antimicrobianos que reduzam e/ou eliminem o maior número de microrganismos, com o propósito de compensar as deficiências no preparo químico-mecânico e proporcionar o reparo dos tecidos periapicais (ANDRADE, 2008; BRUSCO *et al.*, 2002; PIVA *et al.*, 2009).

A utilização da pasta obturadora composta por cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol (CTZ) no tratamento de canais radiculares em dentes decíduos pode ser indicada independente da condição pulpar. Além disso, ela apresenta um protocolo de simples execução, não sendo necessária a instrumentação dos canais radiculares, e custo relativamente inferior quando comparada à técnica endodôntica convencional (OLIVEIRA; COSTA, 2006; GUEDES-PINTO; SANTOS, 2010).

Mesmo sendo escassos os estudos sobre a pasta CTZ, esse material vem apresentando resultados satisfatórios e pode ser usado como material obturador de canais radiculares em dentes decíduos. No entanto, mister se faz que novas pesquisas sejam realizadas com o intuito de assegurar a correta proporção de seus componentes, objetivando controlar a citotoxicidade aos tecidos periodontais sem perder sua capacidade antimicrobiana (BRUSCO *et al.*, 2002).

Nesta perspectiva, as plantas medicinais contêm inúmeros compostos ativos que as tornam importantes para a busca de novos produtos terapêuticos por apresentarem diversas propriedades biológicas, como ação antimicrobiana. Os fitoconstituintes são pequenas biomoléculas orgânicas identificados de extratos, óleos fixos ou essenciais de plantas que podem ser utilizados no tratamento contra agentes infecciosos causados por fungos, vírus, bactérias e parasitas. O citronelol é um fitoconstituente obtido de algumas plantas medicinais e apresenta efeitos antibacteriano, antifúngico, antiespasmódico e atividade anticonvulsivante descritos na literatura (BRITO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2005; SCHELZ; HOHMANN, 2006).

Com base no exposto, o presente estudo busca avaliar a interação medicamentosa entre o citronelol e os componentes da pasta CTZ frente ao *Enterococcus faecalis*, a fim de verificar a possibilidade de suas associações e substituições sem o prejuízo das atividades antibacterianas.

2. REVISÃO DA LITERATURA:

2.1 Micro-organismos presentes em infecções endodônticas

Fatores físicos, químicos e biológicos estão associados ao desenvolvimento de infecções endodônticas. Dentre esses fatores, os microbiológicos, especialmente as bactérias, executam papel fundamental na etiopatogenia das patologias pulpares e perirradiculares (ALVES, 2004).

A microbiota constituinte das infecções endodônticas é constituída de polimicro-organismos complexos que interagem entre si e potencializam seu crescimento (Silva *et al.*, 2010).

Os micro-organismos dispõem de algumas vias de acesso à região pulpar, como os túbulos dentinários, exposição pulpar, periodonto, anacorese hematogênica (SIQUEIRA JR.; LOPES, 2010).

O canal radicular constitui um ambiente propício à proliferação de micro-organismos, já que em seu interior não há circulação sanguínea, protegendo-os dos mecanismos de defesa do hospedeiro e ação de antimicrobianos sistêmicos. A terapia endodôntica, através de um preparo químico-mecânico e obturação adequada, possibilitará a reparação tecidual (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2011).

A microbiota endodôntica de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical é semelhante à encontrada em dentes permanentes. Ela é caracterizada por ser polimicrobiana, com hegemonia de micro-organismos Gram negativos e anaeróbios (SILVA; LEONARDO; NELSON-FILHO, 2005). O estudo de Pazzeli *et al.* (2003), analisou o perfil microbiológico de canais radiculares de dentes decíduos necrosados e com lesão periapical. As amostras foram coletadas em 31 condutos de 18 dentes, logo após o acesso à câmara pulpar com o auxílio de pontas de papel absorvente estéreis. Constatou-se uma prevalência de micro-organismos anaeróbios em 30 canais e de aeróbios em 29 condutos. Vale ressaltar que os estreptococos foram encontrados em 30 canais radiculares, dos quais 15 continham *S.mutans*.

No estudo microbiológico de Baroni, Pimenta e Toledo (2005), foram avaliados 34 dentes fistulados em crianças. Os resultados mostraram a presença de anaeróbios facultativos em 76,5% dos canais radiculares avaliados, sendo o

Streptococcus oralis encontrados em 100% desses casos e o *Streptococcus mutans* em 29,4%.

No estudo de Tavares *et al.* (2011) verificou-se a presença de 83 espécies de bactérias presentes em infecções de dentes decíduos, dentre as quais destacam-se: *Prevotella intermedia*, *Neisseria mucosa*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella denticola*, *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*, *Enterococcus faecalis* e *Eikenella corrodens*.

2.2 Enterococcus faecalis

O *E. faecalis* é responsável por oitenta por cento de todas as infecções causadas por bactérias do gênero *Enterococcus*, sendo uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram positiva e oportunista. Geralmente, essas bactérias são encontradas isoladas em canais radiculares infectados. Mas também, elas podem ser encontradas em outras regiões do corpo, sendo responsáveis por infecções no trato urinário, corrente sanguínea, abdômen, endocárdio e trato biliar (Silva *et al.*, 2010).

Os *Enterococcus* se adaptam facilmente aos diversos tipos de ambiente, podendo crescer em temperatura entre 10 a 45 °C, em pH 9,6, em solução salina 6,5% e sobreviver a 60 °C por 30 minutos (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007). Estudos *in vitro* mostram que o *E. faecalis* sobrevive no interior dos canais radiculares por um período de 12 meses sem nutrientes adicionais e sob várias condições experimentais não-favoráveis, como quando exposto a sais biliares, ácido, calor, falta de glicose, hipoclorito de sódio e água de torneira (CAPIAUX *et al.*, 2000; FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003).

A resistência do *E. faecalis* à ação dos instrumentos endodônticos e às substâncias irrigadoras, deve-se à capacidade de resistir a ambientes alcalinos (devido a sua bomba de prótons que permite acidificar o citoplasma bacteriano); sobreviver em ambientes aeróbios e anaeróbios; se adaptar as diversas necessidades nutricionais; formar biofilme; além de possuir fatores de virulência e aderência ao colágeno dentinário, tornando-o o principal microrganismo presente em infecções endodônticas persistentes (NACIF; ALVES, 2010; ESTRELA *et al.*, 2010).

As infecções endodônticas podem ser classificadas de acordo com o momento em que ocorrem, em três tipos: primária ou inicial, secundária e persistente. A primária é causada por microrganismos (Gram positivos, Gram negativos e anaeróbios) que inicialmente invadem e colonizam a polpa necrótica. A secundária é promovida por microrganismos ausentes na infecção primária, mas que foram introduzidos nos canais radiculares durante procedimentos da terapia endodôntica. A persistente é provocada por micro-organismos de uma infecção primária e/ou secundária que sobreviveram aos procedimentos de esterilização do canal. Nesse último tipo de infecção há predominância do *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA JR.; RÔÇAS, 2011).

Segundo Siqueira Júnior e Lopes (2010), os micro-organismos mais prevalentes na infecção primária são: *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Actinomyces*, dentre outros. Na infecção secundária predominam: *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, dentre outros. Na infecção persistente os principais são: *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* e Fungos.

Em dentes com infecção endodôntica do tipo primária, o *E. faecalis* raramente é encontrado. Em contrapartida, em dentes obturados, e com insucesso pós-tratamento, é o tipo de microrganismo mais comum (FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003).

Pirani *et al.* (2008) analisaram dentes com lesões periapicais primárias e secundárias. O *E. faecalis* foi encontrado em 7,6% nas infecções primárias e 29,1% nas secundárias.

Em pesquisas realizadas por Sedgley *et al.* (2005) foram analisadas a prevalência de *E. faecalis* pelo método PCR e detectaram a presença desse microrganismo em 11% de 100 pacientes que estavam em tratamento endodôntico e em 1% de 100 estudantes que não possuíram nenhum tratamento endodôntico. As cepas de *E. faecalis* foram suscetíveis a ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina e vancomicina. No estudo de Cogulu *et al.* (2008), foi visto que o *E. faecalis* tem elevada resistência à eritromicina e se mostrou sensível a alguns medicamentos, como: ampicilina, azitromicina, tetraciclina e cloranfenicol.

Pinheiro *et al.* (2003) correlacionaram casos de insucesso endodôntico, com bactérias encontradas após a desobturação. Foram analisadas 108 culturas

positivas com 37 espécies diferentes, havendo predominância da *E. faecalis* em 45% das amostras.

Peciulien *et al.* (2000) utilizaram cultivo bacteriológico e investigaram 25 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical e sem sintomatologia. Os resultados mostraram a presença do *E. faecalis* em 70% da amostra. Em 2001, os mesmos autores repetiram o estudo com uma amostra de 40 dentes. Desta vez, o *E. faecalis* foi encontrado em 64% dos casos, sendo a única bactéria presente em 11 destes casos.

Em estudos feitos por Hancock *et al.* (2001) foram analisados os micro-organismos presentes em 54 dentes permanentes com fracasso na terapia endodôntica. Os micro-organismos Gram-positivos estavam presentes em 80,4% dos casos, sendo o *E. faecalis* o mais frequente (30% da amostra).

2.3 Pastas obturadoras de canais radiculares

A utilização de pastas obturadoras com capacidade antimicrobiana constitui um requisito primordial no sucesso do tratamento endodôntico dos dentes decíduos, pois seu uso objetiva compensar as deficiências no preparo químico-mecânico e, proporcionar o reparo dos tecidos periapicais de forma eficaz. Necessita-se, então, de uma combinação de medicamentos para atender aos objetivos de desinfecção dos canais (PINKY; SHASHIBHUSHAN; SUBBAREDDY, 2011; PIVA *et al.*, 2009).

O material obturador dos canais radiculares de dentes decíduos deve possuir algumas características como: ser inofensivo aos tecidos periapicais, não causar danos aos germes dentários permanentes, apresentar reabsorção em casos de extravasamento, ter boa capacidade antimicrobiana, ser de fácil inserção, ter boa adesividade às paredes, ser estável dimensionalmente, ser facilmente removido quando necessário, ser radiopaco e não pigmentar o elemento dentário (ANDRADE, 2008; SIQUEIRA JR, 2010).

Amorim (2005) analisou o efeito antimicrobiano de materiais obturadores indicados na odontopediatria para a eliminação dos micro-organismos envolvidos na infecção endodôntica. A pasta antibiótica CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol) apresentou maior efetividade antimicrobiana, seguida da

pasta de Óxido de Zinco e Eugenol (OZE) e da pasta de Guedes-Pinto (Rifocort®, paramonoclorofenol canforado e iodofórmio).

Ferreira (2009) analisou a ação antimicrobiana da pasta Guedes-Pinto e uma pasta modificada pela substituição do paramonoclorafenicol pelo digluconato de clorexidina a 2%. Foi feito o teste de difusão em ágar, utilizando seis microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. O estudo revelou que a pasta Guedes-Pinto apresentou ação bacteriostática contra todos os microorganismos e também bactericida exceto para *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*. A pasta modificada com digluconato de clorexidina a 2% apresentou ação bactericida e bacteriostática contra todas as cepas.

Dotto *et al.* (2006) testaram a ação antimicrobiana de medicamentos intracanaís frente ao *Enterococcus faecalis*. Foram feitas associações com as seguintes substâncias: o hidróxido de cálcio com propilenoglicol, o hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado (PMCC) e propilenoglicol, a pasta Calen (hidróxido de cálcio), a pasta Calen associada ao PMCC, o hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio e propilenoglicol, o iodofórmio e propilenoglicol e, por último, hidróxido de cálcio com anestésico. Foi visto que houve presença de halos de inibição para o iodofórmio e propilenoglicol e para a associação hidróxido de cálcio, PMCC e propilenoglicol.

Piva, Faraco Junior e Estrela (2008), analisaram a ação antimicrobiana da pasta CTZ, Guedes-Pinto, MTA (silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato), OZE e duas pastas de hidróxido de Cálcio frente ao *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. A pasta CTZ e o MTA foram as únicas capazes de inibir completamente o crescimento microbiano.

2.4 Pasta obturadora CTZ

Em 1959, Capiello e Soler começaram a realizar, na Argentina, o tratamento endodôntico de dentes decíduos usando uma associação entre antibióticos e sem qualquer intervenção nos condutos radiculares. Capiello (1964) descreveu uma técnica executada em sessão única no qual o material obturador era colocado na entrada dos canais radiculares e no assoalho da

câmara pulpar de dentes decíduos com ou sem necrose pulpar. Essa pasta obturadora era composta por partes iguais dos antimicrobianos: tetraciclina, cloranfenicol, óxido de zinco e eugenol (GONZÁLEZ-NUÑEZ *et al.*, 2010).

A pasta CTZ apresenta algumas vantagens quando comparadas à outras pastas obturadoras, por apresentar poder antibacteriano e promover estabilização da reabsorção óssea, apresentar custo relativamente baixo quando comparado com a técnica endodôntica convencional, poder ser indicada independente do diagnóstico pulpar. Pode ser realizada em uma única sessão, sem a necessidade de instrumentação dos canais radiculares, constituindo-se numa importante indicação em casos de pacientes não colaboradores (LEAL; BEZERRA; TOLEDO, 2004; OLIVEIRA; COSTA, 2006; PASSOS; MELO; MOREIRA, 2008).

Na rede pública de saúde destaca-se a indicação do uso da pasta CTZ, principalmente nos serviços onde não é possível executar o tratamento endodôntico tradicional ou a colocação de mantenedores de espaço nas áreas de perda dentária precoce. O tratamento com pasta CTZ pode trazer muitos benefícios para o paciente infantil já que possibilita a manutenção do dente até a época da esfoliação ou pelo menos retarda sua perda precoce (OLIVEIRA; COSTA, 2006). Passos, Melo e Moreira (2008) e Gonçalves (2010) mostraram resultados clínicos e radiográficos positivos em dentes decíduos com prognóstico desfavorável, quando tratados com a pasta CTZ.

Oliveira e Costa (2006) avaliaram o desempenho clínico de pulpotomias com a pasta CTZ em crianças de 4 a 11 anos atendidas no PSF de Goianésia – GO. Alguns critérios foram avaliados no estudo, como: ausência de dor, abscesso, fístula, mobilidade patológica, lesão óssea, reabsorção externa patológica e reabsorção radicular interna. Como resultado, foi verificado uma taxa de 83% de sucesso clínico.

Lacativa, Loyola e Sousa (2012) analisaram, em um período de 4 a 12 semanas, a biocompatibilidade do hidróxido de cálcio, pastas Guedes Pinto e pasta CTZ com e sem eugenol através da técnica de implantes intra-ósseos. Utilizou-se roedores *guinea-pigs* como cobaias e foram feitas perfurações de cada lado da sínfise mandibular. Em seguida, houve o preenchimento da cavidade com os materiais analisados. Após os períodos experimentais, foi feita a avaliação histológica das espécimes. A pasta CTZ com eugenol apresentou

reação inflamatória severa, tecido necrosado, linfócitos, células de corpo estranho e reabsorção óssea. A pasta sem eugenol diminuiu a intensidade das reações inflamatórias, já que o eugenol tem potencial irritante, desencadeia reação de corpo estranho e causam inflamação quando em contato com tecidos periapicais. As reações às pastas de hidróxido de cálcio e Guedes Pinto foram ausentes/suaves.

Piva *et al.* (2009) avaliaram, por meio do teste de difusão em ágar, a capacidade antimicrobiana de seis materiais obturadores: a pasta Guedes-Pinto, a pasta CTZ, a pasta Calen, a pasta L&C (hidróxido de cálcio, carbonato de bismuto, colofônia e óleo de oliva purificado), OZE e o MTA. As cepas utilizadas na pesquisa foram: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Cândida albicans*. As pastas Guedes-Pinto e CTZ apresentaram os melhores resultados. A pasta Calen e o OZE apresentaram resultados inferiores aos materiais supramencionados. Já o MTA e a pasta L&C não apresentaram ação antimicrobiana pelo método usado.

Em uma pesquisa feita por Andrade (2008), a atividade antimicrobiana da pasta CTZ foi comparada com a pasta 3 mix (metronidazol, ciprofloxacina e minociclina), L&C, OZE e Guedes-Pinto, frente aos micro-organismos: *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E.coli* e *P. aeruginosa*. A pasta CTZ revelou atividade antimicrobiana comparável com a pasta 3 Mix e superior às demais testadas, exceto para a *P. aeruginosa*, onde a pasta 3 Mix foi superior.

A pasta CTZ vem sendo utilizada clinicamente há mais de 30 anos. Entretanto, os estudos na literatura revelam a deficiência na quantidade de trabalhos que relatem o efeito da pasta CTZ em dentes vitais, a correta proporção e potencial de toxicidade dos medicamentos utilizados na composição da pasta (ANDRADE, 2008; GONZÁLEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA; COSTA, 2006; PIVA *et al.* 2009).

Costa *et al.* (2012) identificaram que o material obturador mais indicado, pelas 83 instituições de ensino do curso de odontologia no Brasil, foi a pasta Guedes-Pinto (55,6%), seguida da pasta de hidróxido de cálcio, OZE e propilenoglicol (12%), e da pasta OZE (10,8%). A pasta CTZ teve indicação em apenas 1,2% das instituições.

2.4.1 Cloranfenicol

O cloranfenicol é um fármaco bacteriostático muito valioso no tratamento de doenças infecciosas que não respondem ao tratamento com antibióticos menos tóxicos. Foi o primeiro antibiótico de amplo espectro a ser descoberto e possui atividade sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. O mecanismo de ação ocorre reversivelmente no sítio de ligação do RNA-t à subunidade 50 S do ribossomo bacteriano, impedindo a síntese de proteínas através da inibição da peptidiltransferase. A maioria das bactérias anaeróbias são sensíveis a esta droga (YAGIELLA, 2000).

O efeito citotóxico do cloranfenicol é decorrente da inibição da síntese proteica mitocondrial, causando uma supressão da respiração das mitocôndrias. Esse processo compromete a síntese e a proliferação celular. A dose e o tempo de uso do medicamento interfere na reação tóxica (TAVARES, 2009).

Os efeitos tóxicos mais importantes pelo uso desse fármaco, ocorrem na medula óssea. O sistema hematopoiético pode ser afetado, causando anemia, leucopenia ou trombopenia, reação de idiossincrasia manifestada por anemia aplástica, distúrbios gastrintestinais, distúrbios da medula óssea e toxicidade em recém-natos (GONZÁLEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA, COSTA, 2006; STEFFENS *et al.*, 2010).

O potencial de citotoxicidade, o aumento da resistência bacteriana e o aparecimento de fármacos mais eficazes, vem tornando esse medicamento cada vez mais escasso no mercado (ANDRADE, 2008).

Turton *et al.* (2000) realizaram um estudo comparativo entre o succinato de cloranfenicol e o tiafenicol, ambos indutores de anemia aplástica. Foram administradas as doses dos medicamentos por um período de tempo e após a dose final de cada antibiótico fazia-se exames hematológicos. Os autores avaliaram que ambas as drogas reduziram significativamente a contagem de células vermelhas, os valores de hemoglobina e hematócritos. Os autores observaram também que as alterações eram doses-dependentes e reversíveis.

2.4.2 Tetraciclina

A tetraciclina é um bacteriostático que inibe a síntese das proteínas, ao ligar-se de modo reversível à subunidade 30 S ou 40 S do ribossomo bacteriano e ao impedir a ligação do RNA-t nos sítios aceptores dos ribossomos. Sua faixa de atividade antimicrobiana inclui bactérias aeróbias e anaeróbias gram-positivas e gram-negativas. Vale ressaltar que, em elevadas concentrações, também podem exercer atividade bactericida. Podem ocorrer efeitos colaterais dependendo da dose administrada, como: pigmentação dentária, hipoplasia de esmalte e reações fototóxicas na pele. As reações alérgicas raramente são encontradas (TAVARES, 2009; YAGIELLA, 2000).

Esse fármaco pode desencadear alguns efeitos tóxicos sobre o fígado e sistema hematopoiético. O uso desse medicamento é contra-indicado às gestantes pela capacidade da droga de atravessar a barreira placentária, causando manchamento dentário e podendo fixar-se aos tecidos ósseos do feto que estão em formação e causar más formações (TAVARES, 2009).

Os efeitos adversos das tetraciclinas variam de intensidade dependendo de fatores como: idade do indivíduo no momento da administração da droga, da dose utilizada e do tempo de tratamento (LACERDA *et al.*, 2009).

Cavalcanti (2013), analisou a atividade antibacteriana da pasta CTZ através do teste da microdiluição e demonstrou que a tetraciclina foi o antibiótico mais potente frente a *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, além de possuir potencial antimicrobiano semelhante ao do cloranfenicol para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4.3 Óxido de zinco e eugenol (OZE)

O óxido de zinco e eugenol possui ação antimicrobiana e baixo custo, tendo seu uso consagrado na odontopediatria. Na manipulação do OZE ocorre a formação de eugenolato de zinco que ao entrar em contato com meio aquoso, é hidrolisado em hidróxido de zinco e eugenol (ANDRADE, 2008; COSTA *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2010; PIVA *et al.*, 2009).

O óxido de zinco caracteriza-se por possuir capacidade antisséptica, adstringente, reduzida capacidade antimicrobiana e por ser um composto químico insolúvel em água e solúvel em ácidos e bases (SHEN, 2005; TANGERINO, 2006).

O eugenol é um composto fenólico extraído do cravo-da-índia que possui propriedades antimicrobiana, analgésicas e antissépticas. Ele possui ação sobre uma grande variedade de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos, tendo como provável sítio de ação a membrana celular, uma vez que a liberação de prótons de sua estrutura acaba desnaturando a parede celular bacteriana e causando a morte do patógeno. Deve-se evitar seu uso em feridas expostas e na mucosa bucal por ser irritante e desencadear reações alérgicas. O eugenol também apresenta outras propriedades, como: estimulante cardíaco, circulatório, digestivo, respiratório e anti-espasmódico. Esse composto fenólico é tido como o componente dos óleos essenciais com melhor atividade bacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.* por mais de 30 dias (TANGERINO, 2006).

O óxido de Zinco e Eugenol é um dos materiais obturadores mais utilizados em canais radiculares em dentes decíduos. É facilmente introduzido no interior dos canais, promove neoformação óssea e não possui solubilidade aos fluidos orais, porém apresenta pouca adesividade às paredes do canal (CUNHA; BARCELOSS; PRIMO, 2005). Apesar de ser indicado como material obturador em dentes decíduos, apresenta lenta reabsorção quando extravasado pelo ápice, além de não acompanhar o processo de rizólise do elemento decíduo (AZEVEDO; BARCELOS; PRIMO, 2009).

Cavalcanti (2013) observou a efetividade antibacteriana do eugenol sobre cinco microrganismos (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) encontrados nas infecções endodônticas, indicando resultados inferiores quando comparados aos da tetraciclina e do cloranfenicol.

Queiroz *et al.* (2011) analisaram a biocompatibilidade da pasta de óxido de zinco e eugenol (OZE), a pasta Calen espessada com OZE e o cimento Sealapex (hidróxido de cálcio). Para isto, tubos de polietilenos com os materiais estudados foram introduzidos sob o tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. A pesquisa mostrou que dentre os materiais testados, a pasta Calen/Oze apresentou melhor

biocompatibilidade tecidual, seguido pelos cimentos Sealapex e pela pasta OZE respectivamente.

2.5 Fitoterapia e Óleo essencial

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com mais de 20% do número total de espécies do planeta. Atualmente, estima-se que 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente das plantas medicinais (CARVALHO *et al.*, 2007).

As plantas medicinais contêm inúmeros compostos ativos que as tornam importantes para a busca de novos usos terapêuticos. Esses compostos são sintetizados pelas plantas durante seu metabolismo e apresentam diversas propriedades biológicas, como ação antimicrobiana. As plantas, em sua maioria, apresentam várias substâncias com efeitos similares que agem no organismo de uma forma sinérgica, atuando em alvos moleculares distintos (NASCIMENTO *et al.*, 2000; SCHELZ; HOHMANN, 2006, YUNES *et al.*, 2001).

O termo fitoterápico é caracterizado por ser um medicamento obtido exclusivamente de matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a).

Os fitoterápicos ou fitomedicamentos podem ser tão eficazes quanto os medicamentos produzidos com ativos oriundos de síntese química. Contudo, para que isso ocorra, a transformação de uma planta em um medicamento deve preservar a integridade química dos princípios ativos e a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada (TOLEDO *et al.*, 2003).

Os fitoterápicos, de maneira geral, apresentam baixa toxicidade aos mamíferos e rápida degradação. Os fitoterápicos vêm sendo difundido devido aos riscos do uso irracional dos medicamentos alopáticos associados a seus custos elevados. A comprovação da sua ação terapêutica tem favorecido a disseminação desses materiais formados a partir de plantas medicinais (BRITO *et al.*, 2012).

Os fitoconstituintes são pequenas biomoléculas orgânicas identificados a partir de extratos de plantas. Eles apresentam-se como uma possibilidade na obtenção de novos fármacos utilizados no tratamento contra agentes infecciosos causados por fungos, vírus, bactérias e parasitas (LIMA *et al.*, 2005).

Na pesquisa por produtos naturais busca-se a obtenção de fitoconstituintes a partir de extratos, óleos fixos ou essenciais, obtidas de espécies vegetais para uma possível aplicação no combate de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, parasitas e fungos. Os óleos essenciais recebem essa denominação por serem oleosos à temperatura ambiente e são compostos líquidos, orgânicos, lipofílicos, voláteis e aromáticos que podem ser extraídos de várias partes das plantas, como folhas, flores, sementes, galhos, frutos e raízes (ARAÚJO, 2005; GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J., 2008). Segundo Silva *et al.* (2008), a avaliação das propriedades dos óleos extraídos de algumas plantas mostrou que alguns destes demonstravam atividades antibacteriana, inseticidas e antifúngicas.

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de diversas moléculas e os efeitos biológicos podem resultar em uma sinergia de todas as moléculas ou apenas daquelas presentes em concentrações mais elevadas. Os componentes principais, geralmente, refletem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais e a amplitude de seus efeitos é dependente de sua concentração, quando testados sozinhos ou em associação a óleos essenciais (BAKKALI *et al.* 2008, IPEK *et al.*, 2005).

Segundo Ribeiro *et al.* (2013), o uso de óleos essenciais de plantas como antimicrobianos podem ser eficazes no controle de bactérias resistentes, na inibição do microrganismo ou na ação sinérgica com outros antimicrobianos. AIYEGORO *et al.* (2011) constataram que plantas que apresentam compostos antimicrobianos podem agir em sinergia com antibióticos e são capazes de sensibilizar o patógeno a um antibiótico previamente ineficaz. Pesquisas sobre a ação sinérgica entre derivados vegetais e fármacos antimicrobianos convencionais concordam que essa associação é uma nova estratégia para tratamento de infecções, permitindo o aumento da eficácia do agente antimicrobiano (BIAVATTI, 2009; GONZÁLEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009).

A relevância em investigar e identificar compostos de origem vegetal e seus mecanismos biológicos é justificado pela presença de componentes nas plantas que podem ser usados no tratamento de infecções crônicas e doenças infecciosas. Outros fatores também contribuem para o interesse em estudos com fitoterápicos, como: o aumento da resistência microbiana aos medicamentos, presença de efeitos adversos nos medicamentos sintéticos, segurança e eficácia com menor efeito colateral de medicamentos produzidos a partir de fontes naturais e custo menor se comparado com a terapia convencional (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

2.5.1 Citronelol

A citronela é uma planta da Família Poaceae, originária da ilha de Java na Indonésia e cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Essa planta possui alguns compostos, como o citronelol, eugenol, geraniol e limoneno, entre outras, denominadas de um modo geral como monoterpenos do tipo alcóolico. O citronelol é um fitoconstituente encontrado nos óleos essenciais de algumas plantas, como: *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba*. O citronelol apresenta alguns efeitos farmacológicos, tais como: antibacteriano, antifúngico, antiespasmódico e atividade anticonvulsivante (BRITO *et al.*, 2012; SHASANY *et al.*, 2000).

Brito *et al.* (2012), ao realizarem um rastreamento de pesquisas desenvolvidas e patenteadas com o citronelol, concluíram haver um pequeno número de patentes relacionados a esse produto e que o mesmo representa um composto pertinente para inovação tecnológica no âmbito da saúde.

No estudo de Ghannadi *et al.* (2012) foi avaliada a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* que possui 36,4% de citronelol em sua constituição. O estudo foi feito pela técnica difusão em ágar, frente as cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. O óleo essencial puro de *P. graveolens* apresentou halos de inibição para *S. aureus* e *P. aeruginosa* maiores quando comparado à amoxicilina e ao cloranfenicol. A atividade antibacteriana deste óleo é resultante da presença do citronelol e de seu provável efeito sinérgico com os outros fitoconstituintes.

Brito (2013) avaliou a possível ação antinociceptiva e antiinflamatória do citronelol em roedores. Através da imunofluorescência, observou-se que o citronelol é capaz de ativar neurônios do bulbo olfatório (área olfatória primária do cérebro), da substância cinzenta periaquedutal (possui um papel na modulação descendente da dor) e do córtex piriforme e retrosplenial (processa informação olfativa). Concluiu-se com esse estudo, que o citronelol apresenta ação antinociceptiva (anula ou reduz os estímulos de transmissão e percepção da dor) e anti-inflamatória (pela inibição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α) mediada por mecanismos centrais e periféricos. O autor sugeriu que novos estudos fossem feitos para elucidar melhor o perfil analgésico do citronelol.

Em pesquisa realizada por Scherer *et al.* (2009) foram analisadas a ação antioxidante e ação antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus L.*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*). Verificou-se que apenas o óleo de cravo-da-índia (composto de 83,7 % de eugenol) apresentou forte atividade antioxidante. Os três óleos estudados apresentaram ação antimicrobiana de moderada a forte.

No estudo de Bezerra *et al.* (2013) foi analisado, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do citronelol, linalol, timol e D-limoneno sobre *Streptococcus mutans*, *S. salivarius* e *S. oralis*, presentes no biofilme dentário. Realizou-se um screening pela técnica de difusão em meio sólido e avaliou-se que os produtos testados apresentaram atividade antibacteriana, representando possíveis substâncias com aplicabilidade na prevenção da cárie dentária.

Bezerra (2014) avaliou a atividade antibacteriana dos componentes da pasta CTZ individualmente, associadas entre si e associadas ao citronelol frente ao *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Constatou-se que todos os microrganismos foram sensíveis às substâncias nas concentrações testadas, exceto a mistura composta por tetraciclina, cloranfenicol e citronelol frente ao *S. aureus*.

Através do teste de disco difusão em ágar, Kotan, Kordali e Cakir (2007) pesquisaram a atividade antibacteriana de 21 monoterpenos frente a 63 cepas bacterianas. O nerol, linalool, terpineol, fenchol, citronelol e mentol apresentaram os halos de inibição bacteriana mais amplos, sendo o citronelol eficaz contra 33 cepas bacterianas.

Apesar dos poucos estudos realizados com o citrônio, os achados apresentados na literatura indicam propriedades antibacteriana semelhante aos medicamentos usados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar a interação medicamentosa entre o citronelol e os componentes da pasta CTZ frente ao *Enterococcus faecalis*.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar qual das associações medicamentosas apresenta o maior e o menor Índice de Concentração Inibitória Fracionada (IFIC), através do método *checkerboard*.
- Identificar qual o tipo de interação medicamentosa (sinergismo, aditividade, indiferença ou antagonismo) entre as substâncias avaliadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Na presente pesquisa, foi realizada uma abordagem indutiva, com procedimento comparativo-descritivo e técnica de pesquisa por documentação direta em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2010).

4.2 Locais de realização da pesquisa

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral, situado no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.3 Materiais utilizados na pesquisa

Os materiais utilizados e suas respectivas informações técnicas estão descritas no Quadro 1.

| Substância/Material | Fabricante | Lote | Validade |
|--|------------------------------------|-------------|-----------------|
| Cloranfenicol 500mg | Lab. PFizer LTDA | BJ0023B | 05/2014 |
| Cloridrato de tetraciclina 500mg | Prati – donaduzzi e CIA LTDA | 12E01R | 05/2014 |
| Eugenol | Biodinâmica | 1172 | 10/2016 |
| Citronelol | Quinarí | 05209 | 08/2014 |
| Placa para microdiluição | Global Plast | 181212 | 12/2017 |
| Placa de Petri | Deskarplás | 0412 | 04/2015 |
| Alça estéril | Cral artigos para laboratório LTDA | 8514 | 05/2014 |
| Cubetas de poliestireno para espectrofotômetro | Kartell | 3043/09 | 10/2014 |

Quadro 1- Materiais utilizados para realização da pesquisa.

4.4 Cepas Bacterianas

A cepa utilizada, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

A preparação dos inóculos foi realizada a partir da técnica proposta pelo manual do CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute.

4.4.1 Reativação

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa estavam em eppendorfs congelados em glicerol 20%. Na reativação, utilizou-se uma alça de 1 µL descartável e estéril para plaquear as bactérias em placas de Petri contendo MHA (Ágar Müller Hinton – HIMEDIA®, São Paulo, Brasil), possibilitando o cultivo. Em seguida, estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/24hs (Figura 1).

Após 24hs dispensou-se 5-10 colônias da cepa bacteriana em 10 ml de BHI (Brain Heart Infusion, HIMEDIA®, São Paulo) e incubou-se, novamente, em estufa bacteriológica a 37°C/18hs (Figura 1).

4.4.2 Ajuste dos inóculos para realização dos ensaios

Após o intervalo de incubação, uma cubeta de poliestireno contendo 2 ml de meio com a cepa em estudo foi levada ao espectrofotômetro para determinação da concentração das espécies. Uma segunda cubeta com apenas o meio estéril também foi analisada no espectrofotômetro como parâmetro de comparação. Ajustou-se o comprimento de onda do espectrofotômetro para 625nm e as amostras foram submetidas ao teste. Buscou-se o intervalo de absorvância de 0,08-0,1. Caso o intervalo de absorvância (Abs.) fosse atingido, o inóculo ficaria com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Porém, se o intervalo fosse superior ao referido valor, realizaria-se a diluição do inóculo (Figura 1).

4.4.3 Diluição do inóculo

A partir da solução com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, foram feitas diluições (Figura 1) para que quando fosse colocado 10 μ l do inóculo no poço, houvesse uma concentração final com 7×10^5 UFC/mL. De forma que:

I) Retirou-se 800 μ l de um tubo contendo 5ml de BHI. Coletou-se 800 μ l da solução com inóculo na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, adicionando-o ao 4,2mL de meio de cultura estéril.

II) Retirou-se 1ml da solução anterior e acrescentou-se em 9ml de meio de cultura estéril, completando 10 ml de solução com concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL.

III) A solução anterior quando colocada no poço da placa de microdiluição caia 21 vezes, ou seja, sua concentração final era igual a 7×10^5 UFC/mL.

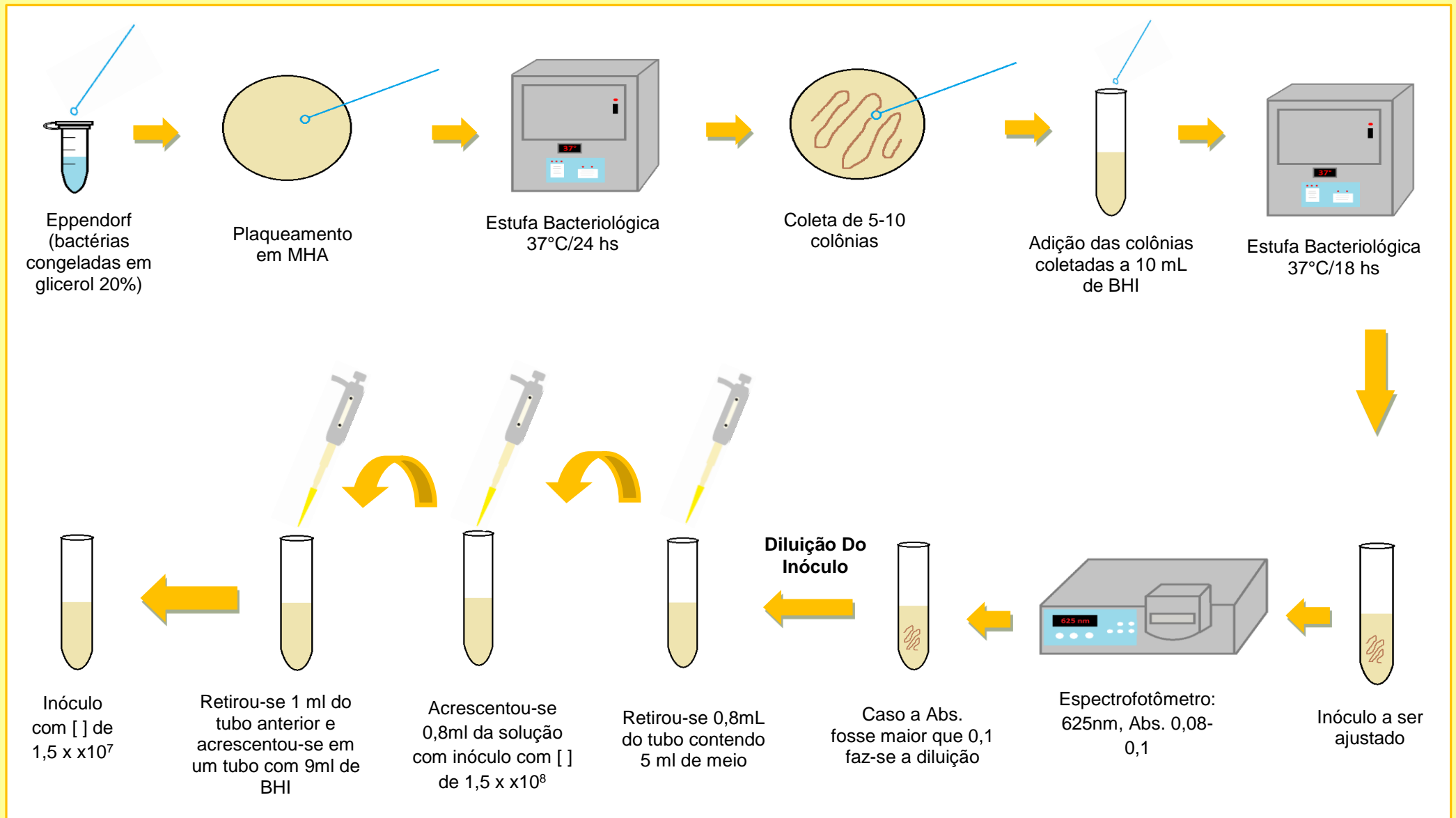


Figura 1: Esquema de preparação dos inóculos bacterianos de acordo com as normas do CLSI.

4.5 Preparo das substâncias

Realizou-se a pesagem de 0,0128g de tetraciclina e cloranfenicol em uma balança de precisão com o auxílio de uma alça de 1 μL descartável e estéril.

A tetraciclina foi adicionada a um tubo de ensaio estéril contendo 5ml de água destilada também estéril, obtendo desta forma, uma solução-mãe com concentração de 2560 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para o preparo da solução de cloranfenicol foram retirados, com o auxílio do pipetador, 300 μL de um tubo contendo 5ml de água destilada e acrescentou-se 300 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) ao referido tubo, obtendo deste forma uma solução-mãe com concentração de 2560 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O DMSO foi utilizado para auxiliar na dissolução do soluto.

A soluções-mães do eugenol e citronelol foram preparadas de acordo com suas densidades, onde de tubos contendo 5ml de água destilada foram retirados com o auxílio do pipetador, 631 μL e 705 μL de água e adicionou-se 631 μL e 705 μL de eugenol e citronelol respectivamente. Além disso, 3 gotas de Tween 80 foram adicionadas em cada tubo para auxiliar na homogenização das soluções, uma vez que se tratam de substâncias com polaridades diferentes. Deste modo a concentração obtida para as soluções de eugenol e citronelol foi de 120.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Todas as soluções-mães foram homogenizadas com auxílio do agitador de tubos. A Tabela 1 apresenta as concentrações das soluções-mães para o citronelol e os componentes da pasta CTZ.

Tabela 1 - Valores das concentrações das soluções-mães, em $\mu\text{g}/\text{ml}$, para tetraciclina, cloranfenicol, eugenol, citronelol.

| | |
|---------------|---------------------------------|
| Tetraciclina | 2560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| Cloranfenicol | 2560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Eugenol | 120.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| Citronelol | 120.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |

Fonte: BEZERRA, 2014.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) corresponde a menor concentração da mistura em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento da cepa bacteriana utilizada no ensaio microbiológico. Após o preparo das

soluções-mães, foram preparadas 7 soluções de cada componente pesquisado com valores: CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8, CIMX2, CIMX4, CIMX8. De tal forma que ao tubo de ensaio estéril foram adicionados 5ml de água destilada estéril, para depois retirar a quantidade necessária dessa água e adicionar a quantidade volumétrica de cada substância. Após adicionadas todas as substâncias, os tubos foram levados ao agitador de tubos para fins de homogeneização. A seguir, a Tabela 2 mostra os valores das CIMs para o *Enterococcus faecalis*.

Tabela 2 - Valores das CIMs de tetraciclina, cloranfenicol, eugenol e citronelol frente ao *Enterococcus faecalis*.

| | |
|---------------|--------------|
| Tetraciclina | 10 µg/ml |
| Cloranfenicol | 20 µg/ml |
| Eugenol | 1875 µg/ml |
| Citronelol | 468,75 µg/ml |

Fonte: BEZERRA, 2014.

4.6 Ensaio de sinergismo - método *checkerboard*

A metodologia dessa pesquisa baseou-se no método *checkerboard* que é um ensaio *in vitro* no qual se analisa o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento bacteriano. O teste *checkerboard* confronta duas substâncias frente a um microrganismo, a partir de seriadas concentrações, para avaliar se elas agem em união ou em antagonismo (JACKSON *et al.*, 2009; NIGHTINGALE *et al.*, 2007). O efeito combinado dos componentes da pasta CTZ e do citronelol foi determinado pelo teste de *checkerboard* através do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (IFIC).

O teste de *checkerboard* segue um padrão de diluição das soluções antibióticas na placa de microdiluição. Na vertical, cada poço contém uma solução, com concentração diferente, diluída de forma decrescente. Já horizontalmente, a segunda solução é adicionada a cada poço da placa, de esquerda para direita de forma crescente. A seguir, a Figura 2 representa um esquema de como foi realizado o teste de sinergismo entre as substâncias.

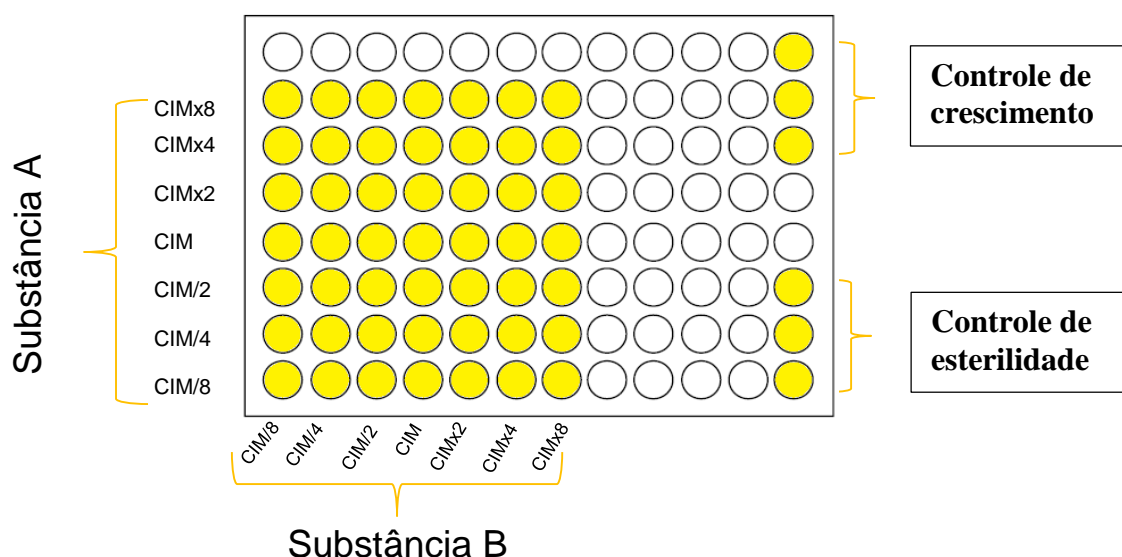


Figura 2 - Esquema do ensaio do sinergismo pelo método checkerboard.

Na pesquisa, foram colocados 100 μ l do meio de cultura BHI em cada orifício da microplaca estéril com fundo em forma de “U”. Posteriormente, 50 μ l de cada solução foram colocados em poços específicos, sendo duas substâncias por placa: uma no sentido vertical e outra no sentido horizontal. Por último, a cada orifício adicionaram-se 10 μ l do inóculo de *E.faecalis*. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C por 18h.

O índice ICIF foi calculado através da soma, dois a dois, do FIC^A e do FIC^B (as letras “A” e “B” representam cada substância). O FIC^A representa CIM^A combinado/ CIM^A sozinho; já o FIC^B é calculado pela relação CIM^B combinado/ CIM^B sozinho. Os resultados foram interpretados de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Interpretação dos valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

| Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF/IFIC) | Interpretação |
|--|--|
| $\leq 0,5$ | Sinergismo (o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais) |
| 0,5 – 1,0 | Aditividade (os resultados finais são semelhantes à soma dos efeitos individuais) |
| $\geq 1,0$ e $\leq 4,0$ | Indiferença (o mecanismo de ação de um medicamento não interfere no mecanismo de ação do outro) |
| $> 4,0$ | Antagonismo (as ações das duas drogas que estão interagindo são opostas) |

4.7 Análise de dados

Os procedimentos para leitura do crescimento bacteriano eram baseados na observação visual que determinou a CIM da mistura das substâncias sobre a cepa de *E. faecalis* a partir da formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade dos poços das placas. Dessa forma, obteve-se a menor concentração da mistura em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento da cepa bacteriana utilizada no ensaio microbiológico.

Para confirmação da presença de micro-organismo viável nas concentrações não inibitórias, utilizou-se o corante TCT 0,5% (2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio) no volume de 20 µL, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular (CASTRO; LIMA, 2013). De forma que se os micro-organismos realizarem respiração celular no poço, este será corado de vermelho. Não haverá alteração da cor na ausência de micro-organismo.

5. RESULTADOS

Na associação entre a tetraciclina e cloranfenicol, houve a redução da CIM da tetraciclina de 10µg/ml para 5µg/ml e uma diminuição da CIM do cloranfenicol de 20µg/ml para 2,5µg/ml, resultando no IFIC de valor 0,625 o que representa aditividade entre as substâncias. A exemplo, o cálculo foi feito da seguinte forma: $FIC^A = CIM^A \text{ combinado (5µg/ml)} / CIM^A \text{ sozinho (10µg/ml)} + FIC^B = CIM^B \text{ combinado (2,5µg/ml)} / CIM^B \text{ sozinho (20µg/ml)}$, resultando no IFIC 0,625.

Para tetraciclina e eugenol, houve redução da CIM da tetraciclina de 10 µg/ml para 1,25µg/ml e a CIM do eugenol se manteve com 1875µg/ml. Essa combinação originou um valor de 1,125 do IFIC, significando indiferença entre os dois componentes na inibição do crescimento do *E. faecalis*.

A interação entre tetraciclina e citronelol resultou na redução da CIM da tetraciclina de 10µg/ml para 2,5µg/ml e a CIM do citronelol diminuiu de 468,75 µg/ml para 234,375µg/ml. Essa associação resultou em um IFIC de valor 0,75, significando aditividade medicamentosa.

Para o teste envolvendo cloranfenicol e eugenol a CIM do cloranfenicol manteve-se com 20µg/ml e a CIM do eugenol reduziu de 1875µg/ml para 937,5µg/ml, resultando no IFIC 1,5 o que representa indiferença entre as substâncias.

O mesmo valor de 0,625 do IFIC foi observado para o teste envolvendo cloranfenicol e citronelol. Nesse caso a CIM do cloranfenicol reduziu de 20µg/ml para 2,5µg/ml e a CIM do citronelol reduziu de 468,75µg/ml para 234,375µg/ml, representando aditividade.

Para o eugenol e citronelol, houve redução da CIM do eugenol de 1875µg/ml para 468,75µg/ml e uma diminuição da CIM do citronelol de 468,75µg/ml para 117,18µg/ml, resultando num IFIC de 0,5. Esse resultado demonstra sinergismo entre as substâncias frente ao *E. faecalis*. A Tabela 4 apresenta os valores do índice ICIF e interpretação dos resultados.

Tabela 4 - Valores do índice ICIF e interpretação dos resultados.

| Mistura | CIM isol. ($\mu\text{g/ml}$) | CIM comb. | ICIF | Interpretação |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------|---------------|
| Tetraciclina + Cloranfenicol | T= 10 C= 20 | T= 5 C= 2,5 | 0,625 | Aditividade |
| Tetraciclina + Eugenol | T= 10 E= 1875 | T= 1,25 E= 1875 | 1,125 | Indiferença |
| Tetraciclina + Citronelol | T= 10 Ci= 468,75 | T=2,5 Ci= 234,375 | 0,75 | Aditividade |
| Cloranfenicol + Eugenol | C= 20 E= 1875 | C= 20 E= 937,5 | 1,5 | Indiferença |
| Cloranfenicol + Citronelol | C= 20 Ci= 468,75 | C= 2,5 Ci= 234,375 | 0,625 | Aditividade |
| Eugenol + Citronelol | E= 1875 Ci= 468,75 | E= 468,75 Ci= 117,18 | 0,5 | Sinergismo |

LEGENDA:

T = Tetraciclina
 C = Cloranfenicol
 E = Eugenol
 Ci = Citronelol

6. DISCUSSÃO

A microbiota endodôntica de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical é caracterizada por ser polimicrobiana, com hegemonia de microrganismos Gram negativos e anaeróbios. O *Enterococcus faecalis* apresenta um papel importante neste tipo de infecção, estando presente, principalmente, nos casos de infecções persistentes (SILVA; LEONARDO; NELSON-FILHO, 2005).

Não há um consenso a respeito da técnica endodôntica preconizada para dentes decíduos com necrose pulpar, pois a complexa anatomia interna dos seus sistemas de canais radiculares compromete o acesso e instrumentação desses dentes. Por isso, é fundamental a utilização de materiais obturadores antimicrobianos que reduzam e/ou eliminem a maior quantidade de microrganismos, proporcionando o reparo dos tecidos periapicais (ANDRADE, 2008; PIVA *et al.*, 2009).

A utilização da pasta CTZ para tratamento de canais radiculares em dentes decíduos pode ser indicada independente da condição pulpar e apresenta uma técnica de fácil execução e de custo acessível (OLIVEIRA; COSTA, 2006). No entanto, ainda existe resistência ao seu uso, provavelmente, devido aos poucos relatos na literatura a respeito da concentração ideal dos componentes presentes na pasta, dos possíveis efeitos adversos advindos da interação medicamentosa e da falta de padronização da manipulação de seus componentes. Alguns profissionais também manifestam receio pelo uso da pasta CTZ devido aos efeitos adversos que a tetraciclina e o cloranfenicol podem manifestar. A presença da tetraciclina em sua composição, provoca dúvidas sobre o uso da pasta CTZ em dentes decíduos, apesar de relatos clínicos comprovarem não haver manchamento do dente sucessor. O cloranfenicol, por sua vez, apesar de sua excelente capacidade antibacteriana, oferece algumas consequências sistêmicas indesejáveis e não conhecidas nas doses usadas no tratamento endodôntico. Pelo exposto, parece lícito afirmar que a substituição de seus componentes por outros com menores contra-indicações e semelhante capacidade antibacteriana ofereceria maior segurança na indicação e uso da pasta no tratamento endodôntico de dentes decíduos. Assim, mais pesquisas a respeito dessa

combinação antibiótica devem ser realizadas para otimizar suas possibilidades de uso e garantir maior segurança desta técnica.

Nessa perspectiva, o uso de plantas medicinais surge como alternativa na substituição dos medicamentos convencionais por apresentarem propriedades semelhantes com custos e contra-indicações menores. O citronelol é um fitoconstituente, presente no óleo essencial de algumas plantas (*Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba*), que apresenta atividade antibacteriana e antifúngica que o tornam indicado para o uso no combate à infecções dentobuciais (BRITO *et al.*, 2012; SCHELZ; HOHMANN, 2006; TOLEDO *et al.*, 2003).

Uma vez conhecidas as propriedades de cada substância, para Secoli (2001) as associações medicamentosas constituem, na atualidade, um dos tópicos mais importantes da farmacologia para a prática clínica dos profissionais da saúde.

Nightingale *et al.* (2007) consideram a técnica *checkerboard* como o método mais utilizado para a compreensão da interação medicamentosa, sendo uma técnica de fácil execução e entendimento. A terapia de combinação pode ser utilizada para expandir o espectro antimicrobiano, para evitar o surgimento de organismos resistentes, para minimizar a toxicidade, e para se obter a atividade antimicrobiana sinérgica (KUMAR *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que as substâncias quando testadas em combinação apresentaram CIM combinada menor ou igual as suas CIMs isoladas. Isso indica que a dose terapêutica do antibacteriano combinado poderá ser menor, prorrogando assim o desenvolvimento de resistência do microrganismo e favorecendo melhores resultados da terapia. A microbiota bucal é mista e a complexidade das infecções orais exigem várias combinações medicamentosas para o seu tratamento, portanto, a efetividade medicamentosa é de primordial importância no combate de infecções polimicrobiana ou originadas por bactérias multirresistentes (PINKY; SHASHIBHUSHAN; SUBBAREDDY, 2011).

Para a interação envolvendo tetraciclina e cloranfenicol, o resultado da pesquisa revelou aditividade medicamentosa (ICIF: 0,625). Isso significa que no combate do *E. faecalis* a dose terapêutica desses antimicrobianos combinados poderá ser menor. No entanto, a literatura relata diversos efeitos colaterais

provenientes do uso dessas drogas, por isso a importância de mais estudos a respeito do potencial antimicrobiano e dos efeitos citotóxicos provindos da interação desses medicamentos.

O resultado da associação entre a tetraciclina e o eugenol mostrou indiferença (ICIF: 1,125), assim como a associação entre cloranfenicol e eugenol (ICIF: 1,5). No estudo de Nascimento *et al.* (2000), a associação do eugenol com outras substâncias antimicrobianas (como a tetraciclina) resultou em sinergismo. No entanto, é válido ressaltar que a atividade inibitória resultante da interação medicamentosa depende dos tipos dos agentes associados, de suas concentrações, do pH do meio e do micro-organismo submetido à ação da combinação (SANTIESTEBAN-LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2006).

A associação de antimicrobianos convencionais com plantas medicinais pode inibir ou acentuar o efeito dos primeiros, ou ainda não interferir na ação esperada (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Os resultados desta pesquisa mostraram que o citronelol associado à tetraciclina resultou em aditividade medicamentosa (ICIF 0,75), o mesmo resultado foi encontrado com uso do cloranfenicol (ICIF 0,625). A associação entre o citronelol e o eugenol foi ainda melhor, resultando em sinergismo com ICIF igual a 0,5 (cuja resultante é maior do que simples soma dos efeitos isolados de cada um deles). Esses resultados indicam que o fitoterápico utilizado no presente estudo possui uma associação positiva com os componentes da pasta CTZ e boa atividade antibacteriana frente ao *Enterococcus faecalis*. Para Bakkali *et al.* (2008), os efeitos biológicos dos óleos essenciais podem resultar em uma sinergia de todas as moléculas ou apenas daquelas presentes em concentrações mais elevadas.

Segundo Bezerra (2014), as CIMs das substâncias da pasta CTZ são muito próximas ou iguais às das associações com o citronelol, demonstrando que a substituição de uma delas não altera, ou altera minimamente a atividade antibacteriana da mistura.

Vale ressaltar a inexistência de estudos na literatura que possibilitasse a comparação com os resultados da presente pesquisa.

Não foi avaliada a interação medicamentosa com o óxido de zinco porque este material não possui atividade antimicrobiana. De acordo com Shen (2005), o óxido de zinco atua no mecanismo de presa do material, através da reação entre o hidróxido de zinco com o eugenol e posterior formação de um quelato.

Os resultados desta pesquisa revelam que o citronelol em associação aos componentes da pasta CTZ apresentou bons resultados frente ao *E. faecalis*, podendo ser um medicamento viável para o tratamento de infecções endodônticas. Porém, estudos mais aprofundados, sobretudo “*in vivo*”, devem ser feitos a fim de que a substituição de uma das substâncias da pasta CTZ pelo citronelol possa melhorar a biocompatibilidade do material sem interferir na atividade antibacteriana.

7. CONCLUSÃO

Baseado na metodologia empregada no presente trabalho, concluiu-se que:

- A interação medicamentosa entre o citronelol e os componentes da pasta CTZ foi positiva.
- A associação entre o cloranfenicol e o eugenol apresentou o maior valor do ICIF, enquanto o menor valor foi apresentado pela associação entre o citronelol e o eugenol.
- Para as associações entre tetraciclina e cloranfenicol, tetraciclina e citronelol, cloranfenicol e citronelol o resultado foi aditividade medicamentosa.
- A interação entre tetraciclina e eugenol, cloranfenicol e eugenol resultou em indiferença entre os compostos analisados.
- Para a mistura envolvendo o eugenol e o citronelol verificou-se o sinergismo entre os componentes.

8. REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, S.H. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.
- AIYEGORO, O. *et al.* Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 7, p. 4477-503, 2011.
- AMORIM, L.F.G. **Estudo Comparativo de Pastas Obturadoras Usadas em Odontopediatria frente a sua Atividade Antimicrobiana**. 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Odontologia; Área de concentração: Odontopediatria) – Universidade de Brasília, Brasília. 2005.
- ANDRADE, F. B. F. S. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de uma pasta antibiótica empregada no tratamento endodôntico de dentes decíduos**. 2008. 100 f. Tese (Mestrado em odontologia) – Universidade do estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.
- ALVES, F.R.F. Compreendendo a etiologia microbiana das infecções endodônticas. **Rev. biociên.**, Taubaté/SP, v.10, n. 1-2, p. 67-71, jan./jun. 2004.
- ARAÚJO, C. R. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J.S. Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anacardium occidentale* Linn. sobre levedura do gênero *Candida*. **Arquivos em Odontologia**, Belo Horizonte, v.41, n.3, p. 193- 272, 2005.
- AZEVEDO, C.P; BARCELOS, R; PRIMO, L.G. Variabilidade das técnicas de tratamento endodôntico em dentes decíduos: uma revisão de literatura. **Arquivos em Odontologia**, Belo Horizonte, v.45, n.01, p. 37-43, 2009.
- BARONI, D.A.; PIMENTA, F.C.; TOLEDO, O.A. Detecção de microrganismos em canal radicular de dentes decíduos com fístulas. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005, n.p.
- BEZERRA, L.M.D. **Atividade antibacteriana dos componentes da pasta CTZ e sua associação com o citronelol**. 2014. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2014.
- BEZERRA, L.M.D. *et al.* Atividade Antibacteriana In Vitro de Fitoconstituintes Sobre Microrganismos do Biofilme Dentário. **Rev. bras ci Saúde**, v. 17, nº1, p.79-84, 2013.
- BIAVATTI, M. W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 371-378, Jul/Sep 2009.

BRASIL 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico unto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRITO, R.G. *et al.* Prospecção tecnológica da utilização do citronelol. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão/SE, v. 2, n. 2, p.166-173, 2012.

BRITO, R.G. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citronelol em roedores**. 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju. 2013.

BRUSCO, E.H.C. *et al.* Procedimentos e substâncias empregadas por Faculdades de Odontologia Brasileiras na terapia endodôntica de dentes decíduos pulpectomizados. **J Bras Odontopediatr Odontol Bebê**. Curitiba, v.5, n.23, p.35-46, 2002.

CAPIAUX, H. *et al.* Characterization and analysis of a new gene involved in glucose starvation response in *Enterococcus faecalis*. **Int J Food Microbiol.**, v. 55, n. 1-3, p. 99-102, 2000.

CAPIELLO, J. Tratamientos pulpares em incisivos primarios. **Rev. Assoc Odont Argentina.**, v. 52, n.4, p. 139-145, 1964.

CARVALHO, A.C.B. *et al.* Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p.26-32, 2007.

CASTRO, R.D. **Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua Associação com Antifúngicos Sintéticos sobre Espécies de *Candida***. 2010. 170f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2010.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Anti-candida activity and chemical composition of cinnamomum zeylanicum blume essential oil. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 56, n. 5, p. 749-755, 2013.

CAVALCANTI, S.L. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos componentes da pasta obturadora CTZ**. 2013. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2013.

COGULU, D. *et al.* Evaluation of Antibiotic Susceptibility of *Enterococcus faecalis* Isolated from deciduous e permanent tooth root canals. **J Hacettepe Faculty of Dentistry**, v.32, n.2, p. 39-44, 2008.

COSTA, L.E.D. *et al.* Panorama do ensino da terapia pulpar em dentes decíduos nos cursos de graduação em odontologia. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v. 12, n.3, p. 425-431, 2012.

CUNHA, C. B. C. S.; BARCELOSS, R.; PRIMO, L.G. Soluções irrigadoras e materiais obturadores utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v.5, n.1, p.75-83, 2005.

DOTTO, S.R. *et al.* Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. **J. Appl Oral Sci.**, v. 11, n. 4, p.269-82, 2003.

ESTRELA, C.R.A. *et al.* Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. **J Appl Oral Sci.**, v.18, n.4, p.426-31, 2010.

FERREIRA, B. O. **Avaliação antimicrobiana de pastas obturadoras a base de hidróxido de cálcio associadas ao digluconato de clorexidina.** 2009. 33f. Dissertação (monografia de final de curso em odontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Piracicaba, 2009.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth, and recovery of *enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.18, n.4, p. 234-239, 2003.

GHANNADI, A. *et al.*, Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 171-176, 2012.

GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. **Fitoterapia**, v. 79, p. 199-203, 2008.

GONÇALVES, S. S. **Análise da atividade antimicrobiana de quatro pastas endodônticas sobre microorganismos removidos da cavidade pulpar de molares decíduos necrosados.** 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2010.

GONZALEZ-LAMOTHE, R. *et al.* Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **Intitute Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 8, p. 3400-19, Oct 2009.

GONZÁLEZ-NÚÑEZ, D. *et al.* Técnica de endodoncia no instrumentada mediante el uso de la pasta CTZ. **Revista de Estomatologia**, v.18, n.2, p. 27-32, 2010.

GUEDES-PINTO, A. C.; SANTOS, E. M. Tratamento endodôntico em dentes decíduos. In: GUEDES-PINTO, A.C. **Odontopediatria**. 8. ed. São Paulo: Santos, 2010. Cap.31. p.587-612.

HANCOCK, H.H *et al.* Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North America population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 91, n. 5, p. 579-86, 2001.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and Euphorbia hirta leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

KOTAN, R.; KORDALIC, S.; CAKIRD, A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, n. 7-8, p. 507-513, 2007.

KUMAR, A. S. *et al.* Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n.1, p. 13-16, 2009.

KUMAR, S.N.; SIJI, J.V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n.11, p. 3143-3150, 2012.

LACATIVA, A. M.; LOYOLA, A. M.; SOUSA, C. J. A. Histological evaluation of bone response to pediatric endodontic pastes: an experimental study in guinea pig. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 635-644, 2012.

LACERDA, I. N. L. *et al.* Manchamento dentário por tetraciclina: como ocorre?. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, Taubaté, v. 21, n. 2, p. 41-46, 2009.

LAKATOS, E.M.; MARCONI, M.A. **Fundamentos de Metodologia Científica**. 7 ed. São Paulo: Atlas, 2010.

LEAL, S.C; BEZERRA, A.C.B; TOLEDO, A.O. Orientações terapêuticas utilizadas pelos cursos de especialização em Odontopediatria no Brasil para cárie severa da infância. **Rev ABENO**, v.4, n1, p.57-62, 2004.

LIMA, I. O. *et al.* Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 199-203, 2005.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**. 4.ed. São Paulo: Livraria Santos editora, 2005. Cap. 2,3 e 4.p. 5-37.

NACIF, M.C.A.M.; ALVES, F.R.F. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Rev. bras. odontol.**, v.67, n.2, p.208-14, jul./dez., 2010.

NASCIMENTO, G.G.F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NIGHTINGALE, C.H. *et al.* **Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice**. 2^a ed. New York Medical, 2007.

OLIVEIRA, M. A. C; COSTA, L. R. R. S. Desempenho clínico de pulpotomias com pasta CTZ em molares decíduos: Estudo retrospectivo. **Robrac**, Goiânia, v.15, n.40, p. 55-63, 2006.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Enterococcus faecalis: Considerações clínicas e microbiológicas. **Rev Odontol UNESP**, v. 36, n. 2, p. 163-68, 2007.

PASSOS, I.A.; MELO, J.M.; MOREIRA, P.V.L. Utilização da pasta CTZ em dente decíduo com necrose pulpar – relato de caso. **Odontologia. Clín.-Cientif.**, Recife, v.7, n.1, p.63-5, jan./mar., 2008.

PAZZELI, L.C. *et al.* Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. **Pesqui Odontol Bras.**, v.17, n.4, p.367-371, 2003.

PECIULIENE, V. *et al.* Isolation of *Enterococcus Faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod.**, v.26, n.10, p. 367-71, 2000.

PECIULIENE, V. *et al.* Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J.**, v.34, n.6, p.429-34, 2001.

PINHEIRO, E.T. *et al.* Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v. 36, n.1, p. 1-11, 2003.

PINKY, C; SHASHIBHUSHAN, K.K.; SUBBAREDDY, V.V. Endodontic treatment of necrosed primary teeth using two different combinations of antibacterial drugs: An in vivo study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, Chandigarh, v. 29, n.2, p. 121-7, 2011.

PIRANI, C. *et al.* Recovery of *Enterococcus Faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. **New Microbial.**, v.31, n 2, p. 235-40, 2008.

PIVA, F. *et al.* Ação Antimicrobiana de Materiais Empregados na Obturação dos Canais de Dentes Decíduos por Meio da Difusão em Ágar: Estudo *in vitro*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v. 9, n.1, p. 13-17, 2009.

PIVA, F.; FARACO JÚNIOR, I.M.; ESTRELA, C. Antimicrobial Activity of Different Root Canal Filling Pastes Used in Deciduous Teeth. **Materials Research.**, v.11, n.2, p. 171-173, 2008.

- QUEIROZ, A. M. *et al.* Subcutaneous Connective Tissue Response to Primary Root Canal Filling Materials. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p. 203-211, 2011.
- RIBEIRO, D.S.; VELOZO, E.S.; GUIMARÃES, A.G. Interaction between the Rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Bahia, v.4, n.1, p.10-19, 2013.
- SANTIESTEBAN-LÓPEZ, A.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. **J Appl Microbiol**, v.102, n.2, p.486–97, 2006.
- SCHELZ, Z.M.J., HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Phytotherapy**, v.77, n.4, p. 279-285, 2006.
- SCHERER, R. *et al.* Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.
- SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Rev. Esc. Enf. USP**, v.35, n. 1, p. 28-34, mar. 2001.
- SEDGLEY, C. M. *et al.* Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp. **Oral Microbiol and Immunology**, v. 20, n.1, p.10-19, 2005.
- SHASANY, A.K. *et al.* Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon Winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.47, n.5, p.553-9, 2000.
- SHEN, C. Cimentos Odontológicos. In: ANUSAVICE, K. J. **Phillips, materiais dentários**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 16.p. 419- 467.
- SILVA, B. M. *et al.* A ação do hidróxido de cálcio frente ao *enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical secundária. **Odonto**, São Bernardo do Campo, v.18, n.36, p.95-105, 2010.
- SILVA, C. B. *et al.* Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida spp.* The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 12, n.1, p.63-66, 2008.
- SILVA, L. A. B.; LEONARDO, M. R.; NELSON-FILHO, P. Tratamento endodôntico de dentes decíduos portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica (necropulpectomia II).In: ASSED, S. **Odontopediatria: bases científicas para a prática clínica**. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- SILVA, O. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Terminalia macroptera* root. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 872-876, 2012.

SIQUEIRA JR., J. F.; LOPES, H. P. **Endodontia: biologia e técnica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SIQUEIRA JR., J. F.; RÔÇAS, I. N. Microbiologia e tratamento de infecções endodônticas. In: COHEN, S.; HARGREAVES, M. **Caminhos da polpa**. 10.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

STEFFENS, H. *et al.* Avaliação do potencial do cloranfenicol para induzir teratogenicamente o aparecimento de fissura palatina em ratos Wistar. **Rev Sul-Bras Odontol.**, v.7, n.2, p.154-8, jun., 2010.

TANGERINO, L.M.B. **Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol**. 2006. 172f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia. Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais.2006.

TAVARES, W.L.F. *et al.* Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Int Endod J.**, v.44, n.3, p.225-35, março, 2011.

TAVARES, W.L.F. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. Cap. 18 e 19. p.301-319.

TOLEDO, A.C.O, *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Ver Lecta, Bragança Paulista**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

TURTON, J.A. *et al.* An assessment of chloramphenicol and thiamphenicol in the induction of aplastic anaemia in the BALB/c mouse. **Food Chemical Toxicology**. v. 38, n.10, p. 925-938, 2000.

YAGIELLA, J.A; NEIDLE, E.A; DOWD, F.J. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 4a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

YUNES, R.A; PEDROSA, R.C; FECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria e fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.