

Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular

Yuri Wanderley CAVALCANTI^a, Ana Luíza Alves de Lima PÉREZ^b, Gabriela Dantas Rocha XAVIER^b, Leopoldina de Fátima Dantas de ALMEIDA^c

^aPós-Graduando, Mestrado em Clínica Odontológica (Prótese Dentária), Faculdade de Odontologia, UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, 13414-903 Piracicaba - SP, Brasil

^bGraduanda em Odontologia, UFPB – Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa - PB, Brasil

^cProfessor Adjunto, Departamento de Odontologia, FACIMP – Faculdade de Imperatriz, 65900-000 Imperatriz - MA, Brasil

Cavalcanti YW, Pérez ALAL, Xavier GDR, Almeida LFD. Inhibitory effect of essential oils against organisms from root canal. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(5): 208-214.

Resumo

Introdução: os óleos essenciais apresentam propriedades biológicas, as quais devem ser estudadas de modo a investigar novas possibilidades de constituição de soluções irrigadoras. **Objetivo:** avaliar o efeito inibitório de óleos essenciais extraídos de plantas sobre a atividade de microrganismos envolvidos na infecção do canal radicular. **Material e método:** foram selecionados os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjerição), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e *Cinnamomum cassia* (canela-da-china). A atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* (ATCC 289065) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi avaliada por meio da triagem da atividade antimicrobiana e da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As soluções de Digluconato de Clorexidina (0,12%) e Hipoclorito de Sódio (1%) serviram de controle. **Resultado:** os halos de inibição do crescimento para *E. faecalis* variaram entre 8,00 e 26,00 mm, enquanto que a variação para *C. albicans* foi entre 26,67 e >35,00 mm. Os óleos essenciais de *T. vulgaris*, *C. martinii* e *C. cassia* apresentaram CIM na concentração 0,56 mg.mL⁻¹ frente às cepas testadas. Menor atividade foi demonstrada por *O. basilicum*, que apresentou CIM nas concentrações 72,00 e 1,12 mg.mL⁻¹ contra *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. **Conclusão:** os produtos testados apresentaram efeito inibitório satisfatório sobre *E. faecalis* e *C. albicans*, destacando-se os óleos essenciais de *T. vulgaris*, *C. martinii* e *C. cassia*.

Palavras-chave: Produtos biológicos; irrigantes do canal radicular; tratamento do canal radicular.

Abstract

Introduction: essential oils have biological properties that should be studied in order to investigate new possibilities for formulating irrigating solutions. **Objective:** the aim was to evaluate the inhibitory effect of essential oils extracted from plants on the activity of organisms involved in root canal infection. **Material and method:** the essential oils from *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Thymus vulgaris* (thyme), *Ocimum basilicum* (basil), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) and *Cinnamomum cassia* (cinnamon) were selected. The antimicrobial activity against *Candida albicans* (ATCC 289065) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) was evaluated by screening for antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The Chlorhexidine Digluconate (0.12%) and 1% Sodium Hypochlorite solutions served as control. **Result:** the zones of growth inhibition for *E. faecalis* varied between 8.00 and 26.00 mm, while the zones of inhibition for *C. albicans* ranged between 26.67 and >35.00 mm. The essential oils from *T. vulgaris*, *C. martinii* and *C. cassia* showed MIC at concentration of 0.56 mg.mL⁻¹ against the tested strains. Minor activity was demonstrated by the essential oil from *O. basilicum*, which presented MIC at concentrations of 72.00 and 1.12 mg.mL⁻¹, against *E. faecalis* and *C. albicans*, respectively. **Conclusion:** the tested products presented satisfactory inhibitory effect against *E. faecalis* and *C. albicans*, with highlight to the essential oils from *T. vulgaris*, *C. martinii* and *C. cassia*.

Keywords: Biological products; root canal irrigants; root canal treatment.

INTRODUÇÃO

A infecção do sistema de canais radiculares ocorre como resultado da atividade múltipla de microrganismos, dentre os quais bactérias Gram positivas, Gram negativas, aeróbias facultativas ou anaeróbias estritas¹. Também podem ser encontrados fungos e vírus^{1,2}. Nesse sentido, o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans* são os microrganismos mais frequentes nas alterações endodônticas, principalmente no que se refere às infecções secundárias e ao aparecimento de lesões perirradiculares^{1,2}.

Com o objetivo de auxiliar o processo de sanificação do sistema de canais radiculares, realiza-se o preparo químico-cirúrgico, pela utilização de instrumentos de limpeza e substâncias antimicrobianas. As principais soluções utilizadas como irrigantes do canal radicular e como adjuvantes no controle da infecção endodôntica são o Digluconato de Clorexidina e o Hipoclorito de Sódio, em diferentes concentrações^{3,4}. A literatura tem demonstrado que ambas as soluções podem ser empregadas na redução da microbiota endodôntica, especialmente representada pelo *E. faecalis*³⁻⁵. Entretanto, ao avaliar o efeito antimicrobiano prolongado, Dametto et al.⁵ (2005) identificaram que o Digluconato de Clorexidina 2%, em comparação à solução de Hipoclorito de sódio a 5,25%, provocou a redução da contagem de *E. faecalis* mesmo após sete dias da realização do preparo químico-cirúrgico.

O Hipoclorito de Sódio, além das propriedades antimicrobianas, constitui uma importante solução empregada na limpeza dos canais radiculares, capaz de dissolver tecidos orgânicos, cicatrizar o debridamento do sistema de canais e apresentar-se biologicamente compatível com os tecidos perirradiculares⁵. No entanto, essa substância possui algumas desvantagens, representadas pela insolubilidade de compostos inorgânicos e pelos casos de hipersensibilidade ao cloro. Dessa forma, estudos têm investigado substâncias capazes de substituir, ou reduzir, a solução de Hipoclorito de Sódio utilizada no tratamento de canais radiculares^{4,5}.

A clorexidina, por ser um agente catiônico, é adsorvida às superfícies oral e microbiana carregadas negativamente, interferindo no equilíbrio osmótico, na formação de película adquirida e na adsorção microbiana às superfícies bucais. Assim, apresenta capacidade de reduzir a formação de biofilme e de inibir a síntese de polissacarídeos insolúveis da matriz microbiana dos biofilmes orais⁴. Esse comportamento bioquímico pode justificar a excelente atividade antimicrobiana e a efetividade clínica dessa solução no combate a *C. albicans* e *E. faecalis*. Entretanto, o Digluconato de Clorexidina apresenta toxicidade em elevadas concentrações, provoca alterações na coloração dentária e não tem a capacidade de dissolver tecidos orgânicos, o que representa aspectos negativos para a sua utilização como substância irrigadora.

O emprego de produtos naturais na clínica odontológica tem sido justificado pelo uso popular, por seu baixo custo e pelo adequado efeito antimicrobiano e anti-inflamatório⁶. Segundo Nascimento et al.⁷ (2007), os produtos naturais apresentam maior atividade antimicrobiana quando na formulação de óleos

essenciais, justificada pela maior concentração de princípios ativos e pela natureza lipídica da substância. A natureza lipossolúvel dos óleos essenciais e de seus constituintes permite a interação com estruturas celulares que têm constituição lipídica, resultando no aumento da permeabilidade das membranas, o que pode provocar desequilíbrio eletrolítico e morte celular.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais foi verificada por vários estudos⁸⁻¹³. Assim, as propriedades biológicas desses extratos vegetais devem ser avaliadas de modo a investigar novas possibilidades de constituição de soluções irrigadoras. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito inibitório de óleos essenciais extraídos de plantas sobre a atividade de microrganismos envolvidos na infecção do canal radicular.

MATERIAL E MÉTODO

1. Delineamento Geral do Estudo

Realizou-se um estudo de abordagem indutiva, com procedimento comparativo-estatístico e técnica de documentação direta em laboratório¹⁴. Os ensaios laboratoriais compreenderam a triagem na atividade antimicrobiana (*Screening*) e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

1.1. Reativação dos microrganismos envolvidos no estudo

As cepas de referência utilizadas no estudo foram *Candida albicans* (ATCC 289065) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). As cepas de *C. albicans* e *E. faecalis* foram reativadas, respectivamente, em Caldo Sabouraud-Dextrose (DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA) e Caldo Infuso de Coração e Cérebro - BHI (DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA), na temperatura de 37 °C. Para a condução do estudo, suspensões dos microrganismos foram preparadas em solução salina, sob a concentração $1,5 \times 10^6$ microrganismos.mL⁻¹, compatível com a Escala de MacFarland.

2. Seleção dos Óleos Essenciais

Para avaliação antifúngica in vitro, foram utilizados óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjerição), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e *Cinnamomum cassia* (canela-da-china). Esses produtos foram obtidos da empresa Ferquima® (Ind. e Com. Ltda) e da Empresa Viessence® (Florianópolis-SC, Brasil), as quais cederam Laudo Técnico com especificações, conforme Quadro 1.

3. Triagem (*Screening*) da Atividade Antimicrobiana

O ensaio para verificação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre *C. albicans* e *E. faecalis* foi realizado pelo método da difusão em meio sólido, por discodifusão. Em placas

Quadro 1. Especificações técnicas dos óleos essenciais utilizados no estudo, segundo laudo técnico expedido por fornecedor

Óleos essenciais	Densidade (g.mL ⁻¹ , 20 °C)	Origem	Fitoconstituintes
<i>Melaleuca alternifolia</i> (melaleuca)	0,896	Austrália	Terpinen-4-ol α-terpineno
<i>Cymbopogon winterianus</i> (citronela)	0,891	China	Citronelal Citronelol
<i>Ocimum basilicum</i> (manjeriçã)	0,898	Brasil	Linalol 1,8-cineol
<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	0,908	França	Timol p-cimeno
<i>Cymbopogon martinii</i> (palmarosa)	0,878	Brasil	Geraniol Acetato de geranila
<i>Cinnamomum cassia</i> (canela-da-china)	0,912	China	Aldeído cinâmico

de Petri estéreis (DISPO PETRI/INTERLAB), foram adicionados 20 mL de ágar Sabouraud Dextrose (DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA) ou de ágar Muller Hinton (DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA) fundido e resfriado a 45-50 °C, para cultivo de *C. albicans* e *E. faecalis*, respectivamente.

Após solidificação do ágar, as suspensões dos microrganismos ($1,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹) foram semeadas com o auxílio de swaab estéril. Em seguida, discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos nos óleos essenciais, em suas formulações puras, sendo posteriormente inseridos sobre o meio de cultura. As soluções de Digluconato de Clorexidina 2% (Clorexidina S. FGM Produtos Odontológicos. Joinville-SC, Brasil) e de Hipoclorito de Sódio 1% (Solução de Milton – Solução 1% de Hipoclorito de Sódio. Asfer-Ind. Química Ltda. São Caetano do Sul-SP, Brasil), disponíveis comercialmente, serviram como controle.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento das cepas, obtidos a partir da ação dos produtos testados, indicaram a atividade antimicrobiana das substâncias empregadas. Os resultados foram avaliados a partir da mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento em milímetros (mm). O ensaio foi realizado em triplicata. Os dados foram tabulados do Programa Microsoft Office Excel 2007® e analisados descritivamente.

4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica da microdiluição^{9,15}.

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram inicialmente diluídos em água destilada estéril, obtendo-se a concentração 16%, considerada a solução-padrão inicial para todos os produtos avaliados⁹. Para obtenção dessas diluições, considerou-se a densidade das substâncias igual a 0,9 g.mL⁻¹, conforme especificações do fornecedor (Quadro 1). Utilizou-se o método de diluição descrito por Cavalcanti et al.⁹ (2011), que compreende as seguintes etapas: foram adicionados, em tubos de vidro estéril, 0,8 mL do óleo essencial, 0,05 mL de Tween 80 e 4,2 mL de água destilada estéril; o conjunto foi agitado durante 5 minutos

em aparelho agitador de soluções tipo Vortex (Mod. AP56, Phoenix) e a concentração final obtida foi de 16%, equivalente a 144 mg.mL⁻¹. Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), os óleos essenciais foram diluídos de forma seriada, mediante emprego da técnica da microdiluição^{9,15}.

A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços (ALAMAR®, Diadema-São Paulo, Brasil), dispostos em 12 colunas (1 a 12) e oito linhas (A a H). Os óleos essenciais e os controles farmacológicos (soluções Digluconato de Clorexidina 2% e Hipoclorito de Sódio 1%) foram distribuídos ao longo das colunas de poços da placa de microdiluição. Realizou-se o controle de crescimento de cepas (controle positivo) e o controle de esterilidade do meio de cultura (controle negativo). Os testes para determinação da CIM foram realizados em triplicata.

Em cada um dos poços das placas de microdiluição, foram inseridos 100 µL de caldo Sabouraud-Dextrose duplamente concentrado (para cultivo fúngico) ou de caldo BHI duplamente concentrado (para cultivo bacteriano). Em seguida, inseriram-se 100 µL das emulsões dos óleos essenciais para obtenção da concentração inicial de 8% (72,0 mg.mL⁻¹) na primeira linha da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes dos óleos essenciais foram obtidas após diluição seriada dos produtos naturais na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de 8% (144 mg.mL⁻¹ - Linha A) até 0,0625% (0,5625 mg.mL⁻¹ - Linha H), pela transferência de 100 µL do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da linha H, foram dispensados 100 µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. As soluções antimicrobianas empregadas como controle não sofreram diluições, sendo avaliadas na concentração de uso clínico.

Posteriormente, foram inseridos 10 µL da suspensão dos microrganismos ($1,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹) em todos os poços, exceto na coluna correspondente ao controle de esterilidade. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°, por 48 horas. A CIM correspondeu à última diluição dos óleos essenciais na qual não foi verificada a presença de precipitado microbiano ou turvação no meio de cultura após o período de incubação. Os dados (diluições seriadas nas quais se observou a

(CIM) foram tabulados do Programa Microsoft Office Excel 2007[®] e analisados descritivamente.

RESULTADO

Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento provocados pelos produtos testados, frente a *E. faecalis* e *C. albicans*, são apresentados na Tabela 1. Os óleos essenciais e os controles inibiram a atividade de *E. faecalis* e *C. albicans*. Os produtos testados apresentaram atividade sobre *E. faecalis*, com halos de inibição variando entre 8,00 e 26,67 mm. Sobre *C. albicans*, os halos de inibição de crescimento provocados por *M. alternifolia*, *C. winterianus*, *O. basilicum* e *T. vulgaris* foram superiores a 35 mm, não sendo possível definir seu diâmetro.

A Tabela 2 apresenta as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos produtos naturais testados contra *E. faecalis* e *C. albicans*. O óleo essencial de *O. basilicum* apresentou o menor efeito inibitório sobre *E. faecalis*, verificado na concentração de 72 mg.mL⁻¹. Sobre *C. albicans*, todos os produtos testados apresentaram atividade inibitória. As soluções de Digluconato de Clorexidina (1%) e Hipoclorito de Sódio (0,5%) inibiram a atividade dos microrganismos avaliados.

Tabela 1. Diâmetros dos halos de inibição do crescimento provocados pelos produtos testados sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Valores expressos em mm

Microrganismos Produtos	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>C. albicans</i> (ATCC 289065)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	8,00	>35,00
<i>Cymbopogon winterianus</i>	9,67	>35,00
<i>Ocimum basilicum</i>	8,67	>35,00
<i>Thymus vulgaris</i>	27,67	>35,00
<i>Cymbopogon martinii</i>	9,67	32,67
<i>Cinnamomun cassia</i>	26,00	33,00
Clorexidina 2%	20,67	26,67
Hipoclorito de Sódio 1%	14,00	32,00

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais testados para as cepas de *E. faecalis* e *C. albicans*. Valores expressos em mg.mL⁻¹

Microrganismos Produtos	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>C. albicans</i> (ATCC 289065)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	18,00	0,56
<i>Cymbopogon winterianus</i>	4,50	0,56
<i>Ocimum basilicum</i>	72,00	1,12
<i>Thymus vulgaris</i>	0,56	0,56
<i>Cymbopogon martinii</i>	0,56	0,56
<i>Cinnamomun cassia</i>	0,56	0,56

DISCUSSÃO

A técnica de discodifusão em ágar é uma das estratégias utilizadas como triagem da atividade antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e de outros produtos com ação antimicrobiana^{7,10,18,19}. Para tanto, a padronização das técnicas empregadas se faz necessária, de modo a viabilizar a sua reprodutibilidade e a comparação com outros estudos^{7,19}. Dessa forma, baseando-se na metodologia descrita e na comparação com os controles (Digluconato de Clorexidina 2% e Hipoclorito de Sódio 1%), os resultados deste estudo são válidos e podem ser comparados a outros relatos da literatura.

Em relação à metodologia de triagem da atividade antimicrobiana, esta se caracteriza por representar um método difundido em ensaios laboratoriais, sendo de rápida e fácil execução, e possibilitando a seleção de produtos com potencial atividade antimicrobiana. Entretanto, a lipofobia do meio de cultura e a viscosidade dos óleos essenciais podem impedir a difusão dos fitoconstituintes no ágar, sendo, assim, caracterizado como um teste de baixa sensibilidade^{8,20,21}.

A triagem da atividade antimicrobiana tem o objetivo de identificar quais dos produtos testados apresentam potencial inibitório contra os microrganismos avaliados, sem estabelecer comparação entre as medidas dos halos de inibição do crescimento^{8,10,19}. O potencial antimicrobiano, representado pelos halos de inibição do crescimento, não pode ser comparado pelas diferentes velocidades de difusão das soluções empregadas no ágar Sabouraud-Dextrose e no ágar Muller Hinton. Assim, após a realização do *screening* da atividade antimicrobiana, pode-se afirmar que todos os produtos testados apresentaram atividade sobre *E. faecalis* e *C. albicans*¹⁰. A comparação do potencial antimicrobiano dos produtos testados foi avaliada pela técnica de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual será discutida posteriormente.

O presente estudo corrobora os achados da literatura quanto à atividade inibitória dos óleos essenciais sobre *C. albicans*⁸⁻¹². No entanto, não foram identificados estudos sobre o efeito inibitório de óleos essenciais contra o *E. faecalis*. Dessa forma, ao confirmar o efeito inibitório sobre *C. albicans* e identificar o potencial antimicrobiano frente a *E. faecalis*, o presente estudo apresenta o potencial para aplicação dos óleos essenciais como substâncias antimicrobianas na prática clínica da Odontologia.

Com o intuito de comparar o efeito antimicrobiano dos produtos testados, realizou-se a determinação da CIM, na qual as substâncias foram avaliadas em concentrações seriadas sobre o estado de suspensão dos microrganismos. A técnica para determinação da CIM empregada neste estudo foi baseada nos protocolos descritos por Freires et al.¹⁵ (2010) e Cavalcanti et al.⁹ (2011), os quais representam modificação das normas estabelecidas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) para avaliação da sensibilidade de leveduras e bactérias aeróbias à terapia antimicrobiana. Os métodos de referência estabelecidos pelo NCCLS padronizam técnicas de microdiluição para determinação da sensibilidade de leveduras (M27-A2) e de bactéria de crescimento aeróbico (M7-A6) à

terapia por antimicrobianos.^{16,17} Esses protocolos consideram a avaliação de agentes antimicrobianos sintéticos, a utilização do meio de cultura RPMI-1640 ou do Caldo Muller Hinton, e a padronização da concentração inicial das substâncias testadas em 1024, 64 ou 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O presente estudo foi desenvolvido em condições diferentes das estabelecidas por NCCLS¹⁶ (2002) e NCCLS¹⁷ (2003), destinados à avaliação da sensibilidade de leveduras e bactérias aeróbias, respectivamente. Segundo Nascimento et al.⁷ (2007), as normatizações M27-A2 e M7-A6, propostas pelo NCCLS, não podem ser seguidas à risca quando da avaliação antimicrobiana de óleos essenciais. Considera-se que as propriedades químicas desses produtos naturais diferem daquelas apresentadas pelas substâncias para as quais a norma foi padronizada. Ou seja, a normatização do NCCLS não atende às especificidades dos óleos essenciais. Dessa forma, foi reproduzido o protocolo descrito por Freires et al.¹⁵ (2010) e Cavalcanti et al.⁹ (2011a), no qual se empregou: a diluição seriada dos produtos testados; a incorporação de emulsificante (Tween 80) na preparação dos óleos essenciais; o meio de cultura Caldo Sabouraud-Dextrose (para cultivo fúngico) e o Caldo BHI - Brain Heart Infusion Broth (para cultivo bacteriano), e as soluções de Digluconato de Clorexidina e Hipoclorito de Sódio como controle.

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, que apresentam insolubilidade em água e complexidade química, o que dificulta a padronização de técnicas confiáveis que possam ser reproduzidas e validadas, de modo a alcançar resultados seguros^{7,9}. Dessa forma, para minimizar a inconsistência dos resultados obtidos, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, com o objetivo de proporcionar maior contato entre os produtos testados e as células fúngicas. Utilizou-se também um agente emulsificante (Tween 80) para permitir a diluição dos óleos essenciais em meio aquoso. Essas medidas contribuem para redução de viés metodológico e comparação entre os produtos naturais testados⁹. Além disso, ao comparar as técnicas de discodifusão e microdiluição para avaliação da atividade antifúngica de produtos naturais, Scorzoni et al.²¹ (2007) identificaram que a microdiluição foi mais sensível para determinação da CIM.

Segundo Menezes et al.²² (2009), extratos vegetais com boa atividade antimicrobiana devem apresentar CIM igual ou inferior a 100 mg.mL^{-1} . Quando da determinação da CIM, todas as substâncias empregadas no presente estudo foram avaliadas em concentrações inferiores a 100 mg.mL^{-1} , o que indica adequada atividade inibitória em baixas concentrações. Diferentemente dos demais produtos, os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *C. winterianus* e *O. basilicum* apresentaram CIM maior que 0,56 mg.mL^{-1} sobre a *E. faecalis*, sendo menor atividade antibacteriana verificada pelo óleo essencial de *O. basilicum* (CIM = 72 mg.mL^{-1}). Sobre *C. albicans*, os produtos testados apresentaram ação em concentrações inferiores a 1,12 mg.mL^{-1} . Portanto, os resultados deste estudo apontam que as substâncias testadas apresentam potente ação inibitória, com potencial para constituição de produtos odontológicos com atividade antimicrobiana, a exemplo de soluções irrigadoras do canal radicular.

O presente estudo demonstrou que os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *C. winterianus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *C. martinii* e *C. cassia* apresentaram atividade contra as cepas de *C. albicans* e *E. faecalis*, em concentrações inferiores a 100 mg.mL^{-1} , o que denota adequada atividade antimicrobiana^{9,22}. No entanto, não foram identificados estudos que reportaram o efeito inibitório de óleos essenciais sobre a atividade de *E. faecalis*, especialmente pela determinação da CIM. Nesta investigação, os óleos essenciais de *T. vulgaris*, *C. martinii* e *C. cassia* apresentaram efeito semelhante aos controles, inibindo a atividade de *E. faecalis* na concentração 0,56 mg.mL^{-1} . Os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *C. winterianus* e *O. basilicum* também apresentaram efeito antibacteriano, porém em concentrações que variaram de 4,5 a 72 mg.mL^{-1} , sendo menor atividade observada para *O. basilicum*. Dessa forma, sugere-se que outros estudos sejam realizados, de modo a confirmar a atividade antibacteriana desses produtos naturais diante de bactérias que compõem os biofilmes orais.

Quanto à atividade dos óleos essenciais sobre o crescimento de *C. albicans* e à respectiva determinação da CIM, o presente estudo corrobora os achados de Cavalcanti et al.⁹ (2011); Duarte et al.¹¹ (2005); Giordani et al.¹² (2006), e Hammer et al.¹³ (2004). Nas investigações para determinação da CIM dos óleos essenciais sobre as cepas de *Candida*, observou-se a inibição do crescimento fúngico em baixas concentrações. Semelhante ao presente estudo, Cavalcanti et al.⁹ (2011a); Duarte et al.¹¹ (2005), e Giordani et al.¹² (2006) reportaram a CIM dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *C. winterianus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *C. martinii* e *C. cassia* em concentrações inferiores a 1%. Os resultados deste estudo demonstraram que apenas o óleo essencial de *O. basilicum* apresentou CIM na concentração 1,12 mg.mL^{-1} , enquanto os demais produtos demonstraram efeito inibitório na concentração 0,56 mg.mL^{-1} . Dessa forma, verifica-se que os óleos essenciais e os controles apresentaram efeito adequado e semelhante, quando da inibição de *C. albicans*.

Segundo Souza et al.²³ (2005) e Mondello et al.²⁴ (2006), a atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente dos principais fitoconstituintes, como terpinenol, terpineno, linalol, geraniol, timol, citronelal, cineol, limoneno e cimeno. Esses componentes são responsáveis pelas propriedades antissépticas e antimicrobianas dos óleos essenciais, e devem ter suas propriedades físico-químicas e biológicas investigadas^{23,24}. O presente estudo não avaliou a atividade inibitória dessas substâncias, porém a composição informada pelo laudo técnico dos óleos essenciais justifica o efeito inibitório desses produtos em relação às cepas de *C. albicans* e *E. faecalis*.

Ao avaliar os efeitos da ação antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, Hammer et al.¹³ (2004) verificaram que esse óleo essencial alterou a permeabilidade e a fluidez da membrana entre as concentrações 0,25 e 1,0%, o que sugere a ação antifúngica pelo comprometimento das funções celulares e pela alteração das propriedades da membrana. Este comportamento pode justificar a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* e dos demais produtos testados neste estudo, os quais apresentaram CIM inferior a 1,12 mg.mL^{-1} (0,12%) sobre *C. albicans*.

As soluções de Digluconato de Clorexidina e Hipoclorito de Sódio são empregadas, em diferentes concentrações, no preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares infectados^{3,4}. Esses compostos atuam pela alteração do equilíbrio osmótico e pela dissolução dos biofilmes orais⁴. O presente estudo confirmou a efetividade dessas soluções antimicrobianas e revelou que os óleos essenciais apresentaram efeito semelhante em concentrações inferiores a 1 e 0,5%. Dessa forma, validados pela comparação com o controle de crescimento dos microrganismos e o controle farmacológico das soluções antimicrobianas, os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório satisfatório contra os microrganismos testados.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais não foi completamente descrito, porém os estudos de Cavalcanti et al.²⁵ (2011) e Hammer et al.¹³ (2004) sugerem que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se deve à interação desse produto natural e de seus fitoconstituintes com as membranas celulares, o que pode levar à alteração da permeabilidade celular, ao desequilíbrio hidroeletrólítico e à lise de membrana. Conforme observado por Cavalcanti et al.²⁵ (2011), que realizaram uma análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos efeitos provocados pelo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), a análise em MEV evidenciou alterações morfológicas causadas pelo óleo essencial, o que confirma a hipótese de que esses produtos alteram a permeabilidade celular.

Considerando-se as possibilidades de emprego dos extratos vegetais na clínica odontológica, Cavalcanti et al.²⁶ (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana do Hidróxido de Cálcio associado a produtos naturais (tintura de romã, tintura de própolis e óleo essencial de eucalipto). O estudo de Cavalcanti et al.²⁶

(2010) comprovou maior efeito inibitório das pastas de Hidróxido de Cálcio disponíveis comercialmente (Calen® e Calen PMCC®), porém abriu perspectivas para o emprego de produtos naturais, diante da adequada atividade inibitória dessas substâncias.

Pelo reconhecido efeito tópico^{8,27}, os óleos essenciais podem constituir a formulação de colutórios, dentifrícios, irrigantes do canal radicular e outros materiais com ação antimicrobiana. Considerando-se o potencial de aplicação dos óleos essenciais em Endodontia, sugere-se a sua incorporação na formulação de materiais odontológicos com atividade antimicrobiana (pastas de preenchimento provisório e cimentos endodônticos), de modo a auxiliar a obliteração dos túbulos dentinários e o controle do biofilme endodôntico.

No entanto, a inibição dos microrganismos envolvidos na infecção endodôntica não justifica o emprego desses produtos na prática clínica. O efeito inibitório sobre biofilmes, a biocompatibilidade, a citotoxicidade e a capacidade de solubilizar o conteúdo dentinopulpar são aspectos que devem ser considerados quando da perspectiva de uso clínico dos produtos naturais. Assim, sugere-se que novos estudos sejam realizados de modo a avaliar as possibilidades de emprego dos óleos essenciais como constituintes de materiais dentários e produtos odontológicos com atividade antimicrobiana.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que os produtos testados apresentaram efeito inibitório satisfatório sobre aos microrganismos *E. faecalis* e *C. albicans*. Melhor efeito foi observado para os óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon martinii* e *Cinnamomum cassia*.

REFERÊNCIAS

1. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J Endod. 2002;28:304-10. PMID:12043869. <http://dx.doi.org/10.1097/00004770-200204000-00011>
2. Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. Int Endod J. 2004;37:542-51. PMID:15230907. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00840.x>
3. Estrela C, Silva JA, Alencar AHG, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* – a systematic review. J Appl Oral Sci. 2008;16:364-8. PMID:19082392. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572008000600002>
4. Estrela CRA, Ávila GEG, Decurcio DA, Silva JA, Estrela C. Eficácia da clorexidina em infecções endodônticas – revisão sistemática. Rev Bras Odontol. 2009;66:133-41.
5. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:768-72. PMID:15897866. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.08.026>
6. Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:466-76. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300022>
7. Nascimento PFC, Nascimento ALC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:108-13. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>
8. Almeida LFD, Cavalcanti YW, Viana WP, Lima EO. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida albicans*. Rev Bras Ciênc Saúde. 2010;14:51-6.
9. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de três Óleos Essenciais sobre cepas de *Candida*. ROBRAC: Rev Odontol Brasil Central. 2011; 20:77-82.
10. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. Odontol Clín-Cient. 2011;10:243-6.

11. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti- *candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. J Ethnopharmacol. 2005;97:305-11. PMID:15707770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>
12. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. Potentiation of Antifungal Activity of Amphotericin B by Essential Oil from *Cinnamomum cassia*. Phytother Res. 2006;20:58-61. PMID:16397923. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1803>
13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Antimicrob Chemother. 2004;53:1081-5. PMID:15140856. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh243>
14. Lakatos EM, Marconi MA. Fundamentos da metodologia científica. São Paulo: Atlas; 2009.
15. Freires IA, Alves LA, Jovito VC, Almeida LFD, Castro RD, Padilha WWN. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. Odontol Clín-Cient. 2010;9:139-43.
16. NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras. Norma M27-A2 NCCLS. Pensilvânia:Wayne; 2002.
17. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (Approved standard M7-A6). 6th ed. Pensilvânia:Wayne; 2003.
18. Mothana RAA, Abdo SAA, Hasson S, Althawab FMN, Alaghbari SAZ, Lindequist U. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. Evid Based Complement Altern Med. 2010;7:323-30. PMID:18955315. PMID:2887327. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nen004>
19. Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:102-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>
20. Allen KL, Molan PC, Reid GM. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. J Pharm Pharmacol. 1991;43:817-22. PMID:1687577. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03186.x>
21. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2007;28:25-34.
22. Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP. 2009;38:184-91.
23. Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Braz Arch Biol Technol. 2005;48:245-50. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000200011>
24. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida species*. BMC Infect Dis. 2006;6:158-65. PMID:17083732. PMID:1637110. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-6-158>
25. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. Rev Odonto Cienc. 2011;26:139-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S1980-65232011000200008>
26. Cavalcanti YW, Costa MMTM, Almeida LFD, Padilha WWN. Antimicrobial activity and pH evaluation of calcium hydroxide associated with natural products. Ciênc Odontol Bras. 2010;13:49-54.
27. Claffey N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. J Clin Periodontol. 2003;30:22-4. PMID:12787200. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-051X.30.s5.8.x>

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Yuri Wanderley Cavalcanti

Av. Des. Hilton Souto Maior, 6701, Quadra 765, Lote 117, Portal do Sol, 58046-600 João Pessoa - PB, Brasil

e-mail: yuri.wanderley@yahoo.com.br

Recebido: 01/10/2011

Aceito: 31/10/2011