

Efeito antibiofilme e citotoxicidade do hidróxido de cálcio associado ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Ana Clara Kuerten Gil¹  | Taynara Santos Goulart¹  | Michelli Buratto² | Emily Marques dos Reis²
 Luismar Marques Porto²  | Josiane de Almeida¹ 

¹Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, Santa Catarina, Brasil

²Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Objetivo: Avaliar e comparar os efeitos antimicrobiano e antibiofilme, e a citotoxicidade promovida pela associação do hidróxido de cálcio ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (MA), em diferentes concentrações, e ao propilenoglicol (PG).

Métodos: As seguintes medicações compuseram os grupos experimentais: G1) HC/MA 1%; G2) HC/MA 5%; G3) HC/MA 10%; G4) HC/MA 20%; e G5) HC/PG. Solução salina 0,85% e meio DMEM serviram como controle nos testes antimicrobianos e de citotoxicidade em fibroblastos do ligamento periodontal humano (FbLP), respectivamente. A atividade antimicrobiana (n = 12) foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar. O efeito antibiofilme (n = 12) imediato das medicações foi avaliado por meio do teste de viabilidade bacteriana em biofilmes de 72 horas de *E. faecalis*, formados sobre discos de dentina e tratados por sete dias com as medicações. Após a coleta microbiológica do biofilme remanescente, os discos de dentina foram imersos em meio estéril e armazenados por mais sete dias, para a análise do efeito antibiofilme residual das medicações, quando nova coleta microbiológica foi realizada. A atividade metabólica de FbLP foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTS (n = 9). Os valores médios dos halos de inibição, em mm, das unidades formadoras de colônia, e o percentual de atividade metabólica celular foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* Dunn ($\alpha = 5\%$).

Resultados: Todas as medicações experimentais apresentaram superior ação antimicrobiana e antibiofilme comparadas ao controle, solução salina ($p < 0,05$), e mantiveram viáveis os FbLP, semelhante ao controle DMEM ($p > 0,05$).

Conclusão: A associação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, nas concentrações de 1%, 5%, 10% e 20%, ao hidróxido de cálcio promoveu excelente ação antimicrobiana, antibiofilme e biocompatibilidade com fibroblastos, de forma semelhante à associação com propilenoglicol.

Descritores: Endodontia. *Enterococcus faecalis*. Fibroblastos. Óleo de melaleuca. Óleos voláteis.

Submetido: 19/07/2020

Aceito: 06/09/2020

INTRODUÇÃO

A eliminação dos microrganismos presentes nos canais radiculares é imprescindível para o sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos (REPs)¹. Com esse intuito, a

Associação Americana de Endodontia² sugere um protocolo de desinfecção baseado no uso do hipoclorito de sódio a 1,5%, como solução irrigadora, e da pasta de hidróxido de cálcio (HC) ou da pasta triantibiótica (TAP), como medicação intracanal. A TAP, entretanto, apresenta

Autor para Correspondência: Josiane de Almeida Cava da Silveira

Rua Fernando Bauther da Silva, 400, Ingleses do Rio Vermelho, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. CEP: 88.058.408. Telefone: +55 48 99976 7075. E-mail: dealmeidajosiane@hotmail.com

não apenas o inconveniente de promover a descoloração da coroa dental, devido a presença da minociclina em sua composição³, como também há evidência de seu efeito citotóxico⁴. A pasta de HC, por sua vez, é amplamente utilizada como medicação intracanal, tanto para o tratamento de infecções endodônticas primárias, como por exemplo, nos casos de dentes com rizogênese incompleta que sofreram necrose pulpar⁵, como em infecções secundárias ou persistentes⁶. Contudo, a habilidade do HC na erradicação das espécies bacterianas é questionável^{7,8}, visto que biofilmes ainda são detectados no sistema de canais^{9,10}, o que poderia comprometer a efetividade dos REPs.

A ação antibacteriana do HC depende de alguns fatores, como a manutenção do seu alto pH, que pode ser alterado pela dentina¹¹, o tempo em que a pasta permanece no interior do canal e o tipo de veículo utilizado, o qual influencia a dissociação dos íons cálcio e hidroxila nos túbulos dentinários¹². Quando o HC é associado à veículos inertes, como água destilada ou propilenoglicol (PG), diversos estudos demonstram, inclusive, um aumento na quantidade de bactérias ou toxinas intracanal após seu emprego^{13,14}. Assim, com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana, diferentes partículas e veículos têm sido associados ao HC^{15,16}. Tal estratégia poderia ser uma alternativa potencial nos REPs. O uso dos óleos essenciais, mais especificamente o de *Melaleuca alternifolia* (MA), é recente na área endodôntica, mas resultados promissores já foram demonstrados quando o óleo foi empregado na forma de solução irrigadora¹⁷. Quando associado ao HC, além de agregar valor bactericida à pasta, o óleo de MA também ajuda na distribuição dos íons cálcio e hidroxila na massa dentinária, difundindo-os para o interior dos túbulos dentinários, promovendo um aumento do potencial antimicrobiano¹⁶.

Além do efeito antimicrobiano desejável e indispensável para o sucesso da regeneração pulpar, também é necessário que a medicação intracanal seja biocompatível com os fibroblastos do ligamento periodontal humano (FbLP), possibilitando o reparo dos tecidos perirradiculares¹⁸. Até o momento, o HC é um dos medicamentos mais recomendados em endodontia regenerativa^{19,20} por não ser citotóxico²¹ e por demonstrar resultados bem-sucedidos em estudos clínicos²². No entanto, com base na literatura disponível, não foram encontradas evidências sobre a biocompatibilidade do óleo de MA com FbLP. Alguns registros demonstram que formulações

do óleo com concentrações entre 5 e 100% têm ocasionado leve ou nenhuma irritação sobre células da epiderme²³, e que o efeito citotóxico é dose-dependente entre concentrações que variam de 0,1% a 100%^{24,25}. Quando empregado na concentração de 1%, o óleo de MA foi capaz de manter 90% de fibroblastos da derme viáveis²⁴. Ainda que seja bem tolerado por alguns tipos de células e também tenha demonstrado redução no quadro inflamatório dos tecidos gengivais, nos casos de periodontite²⁶, seu efeito citotóxico, quando associado ao HC, sobre FbLP, ainda é desconhecido.

Com o intuito de testar uma nova medicação intracanal para uso em endodontia regenerativa, o objetivo da presente investigação foi avaliar e comparar os efeitos antimicrobiano e antibiofilme, e a citotoxicidade promovida pela associação do hidróxido de cálcio ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (MA), em diferentes concentrações, e ao propilenoglicol.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (protocolo nº 02427418.6.0000.5369) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (parecer 18.018.4.02IV) da Universidade do Sul de Santa Catarina.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram submetidos aos testes cinco grupos experimentais, resultantes da associação de HC com diferentes concentrações do óleo essencial de MA (WNF Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), e também com PG (veículo convencional) (Quimidrol Comércio Indústria Importação Ltda, Joinville, SC, Brasil), conforme segue: G1) HC/MA 1%; G2) HC/MA 5%; G3) HC/MA 10%; G4) HC/MA 20%; e G5) HC/PG. Solução salina 0,85% (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil) serviu como controle nos testes antimicrobiano e antibiofilme. Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich) foi empregado como controle no teste de citotoxicidade.

O óleo de MA, na concentração de 100%, foi diluído nas concentrações finais (1%, 5%, 10% e 20% v/v), em água destilada estéril. Para a obtenção da pasta de HC/MA e HC/PG, foram espatulados dois gramas de HC Pró-Análise (P.A.) (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) com 70 gotas dos veículos, MA ou PG, resultando uma pasta com consistência de creme dental.

ESPÉCIE BACTERIANA

Foi utilizada a espécie bacteriana anaeróbia facultativa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (INCQS 00033, Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Uma cultura fresca foi obtida por meio da incubação *overnight* de 500 µl do estoque em 10 ml de meio caldo cérebro-coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) (KASVI, Curitiba, PR, Brasil), pH 7,1, a 37 °C, em condições de crescimento estático e aerobiose.

TESTE ANTIMICROBIANO DE DIFUSÃO E ÁGAR

O inóculo de *E. faecalis* foi diluído em caldo BHI (KASVI), de forma a se obter uma suspensão de aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/ml (0,5 na escala nefelométrica de McFarland / $DO_{600} \approx 0,5$). Após, 100 µl da suspensão foram plaqueados sobre ágar BHI (KASVI) e espalhados com *swab* estéril em três direções. Foram feitas seis perfurações ($\varnothing = 5$ mm), em pontos equidistantes, no ágar de cada placa. Em cada perfuração foi colocado 0,2 ml de cada medicação, correspondente aos grupos experimentais. Discos de papel filtro ($\varnothing = 5$ mm) (Unifill, Curitiba, PR, Brasil) foram umedecidos com 10 µl de solução salina 0,85% (controle). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, em aerobiose. Os diâmetros dos halos de inibição e supressão formados ao redor de cada material foram mensurados, em mm, com o auxílio de um paquímetro digital e microscópio óptico. Foram confeccionadas três placas em cada replicata, sendo o experimento realizado em triplicata. O valor médio dos halos de inibição e supressão para cada material foi considerado para a análise estatística.

PREPARO DOS DENTES BOVINOS

Dezoito dentes incisivos bovinos tiveram suas coroas e a porção apical removidas com o auxílio de um disco diamantado dupla-face (Microdont, São Paulo, SP, Brasil), de forma a se obter segmentos radiculares de aproximadamente 20 mm de comprimento. Após, o tecido pulpar foi extirpado com o auxílio de extirpa-nervos nº 50 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). Os segmentos radiculares foram seccionados e discos de dentina padronizados (4 mm altura x 4 mm largura x 2 mm espessura) foram obtidos, totalizando 72 amostras. Para a remoção da lama dentinária, os discos de dentina foram

imersos em 3 ml de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil), seguido de 3 ml de NaOCl 1% (Asfer Indústria Química, São Caetano do Sul, SP, Brasil). Previamente à formação do biofilme, todos os discos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 24 minutos.

FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *E. FAECALIS*

O biofilme cresceu em meio caldo BHI (KASVI), pH 7,1, contendo sacarose 0,2%. Para tal, um modelo de adesão ativo foi utilizado, de acordo com um protocolo previamente publicado²⁷, com adaptações. Poços de uma placa de cultura de 24 poços foram preenchidos com 1,5 ml/poço de meio de crescimento, inoculado com a cultura de *E. faecalis* diluída 1:100 ($DO \approx 0,5$ nm). A placa foi fechada com uma tampa customizada de aço inoxidável contendo 24 grampos, os quais prenderam os discos de dentina bovinos previamente preparados e padronizados, que serviram de substrato para o crescimento do biofilme. Quando posicionada na placa, a tampa do modelo permitiu que os discos ficassem imersos e suspensos na cultura bacteriana. O aparato foi incubado por sete dias em aerobiose, a 37 °C, com renovação diária do meio.

TESTE DE VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA

Para a remoção das células bacterianas não aderidas ao biofilme, a tampa do modelo de adesão ativo foi transferida para uma nova placa de 24 poços contendo 1,5 ml/poço de tampão fosfato-salino (PBS) (Sigma-Aldrich). Após, os biofilmes foram tratados durante sete dias por meio da imersão em 1,7 mL/poço dos diferentes materiais ($n = 4$), sob condições aeróbias a 37 °C. Após este período, os discos de dentina foram lavados por três vezes com PBS (Sigma-Aldrich). Para determinar o efeito antibiofilme imediato dos materiais sobre o número de células bacterianas aderidas viáveis, os discos de dentina foram removidos da tampa e transferidos para recipientes plásticos contendo 2 ml de PBS (Sigma-Aldrich). Os biofilmes foram removidos dos substratos por meio da sonicação em gelo por 45 segundos a uma amplitude de 40 W, e as suspensões resultantes foram serialmente diluídas²⁷. Alíquotas de 100 µl foram plaqueadas em meio ágar BHI (KASVI). As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C, por 48 horas. Após, o número de UFC/ml foi determinado. Para a determinação do efeito antibiofilme residual dos materiais, após a sonicação das amostras, os discos de dentina foram reposicionados na tampa

do modelo. A tampa foi transferida para uma nova placa de 24 poços contendo 1,5 ml/poço de meio de caldo BHI (KASVI) estéril, e o aparato foi incubado por 7 dias em condições aeróbicas a 37 °C, com renovação diária do meio. Após esse período, os discos de dentina foram removidos da tampa e submetidos ao mesmo processo de sonicação, obtenção das suspensões, diluições, plaqueamento, incubação e determinação de UFC/ml. O experimento foi realizado em triplicata.

CULTIVO CELULAR

FbLP humano foram cultivados a partir da coleta do ligamento periodontal aderido ao terço médio da raiz de dentes humanos extraídos, provenientes de indivíduos com idade entre 18 e 40 anos. O tecido coletado foi fragmentado em partes de aproximadamente 1 mm², e cinco fragmentos foram transferidos para placas de Petri, contendo 20 ml de meio DMEM (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) e 1% de antibióticos (penicilina, estreptomina e anfotericina). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. A migração e o crescimento celular proveniente dos fragmentos foram observados diariamente através de um microscópio invertido (40x), sendo o meio de cultura renovado a cada 2 ou 3 dias. Quando as células atingiram uma confluência de aproximadamente 80%, estas foram lavadas com tampão PBS (Sigma-Aldrich) e dissociadas da placa de cultivo com 3 ml de tripsina 0,05% (Thermo Fisher Scientific do Brasil Ltd., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foram adicionados 20 ml de meio DMEM para inativação da tripsina, e a partir da suspensão obtida foi feita a contagem de células. Foram utilizadas suspensões celulares da terceira passagem para o teste de citotoxicidade celular.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Corpos de prova foram confeccionados por meio da inserção das medicações, correspondentes aos grupos experimentais, em moldes metálicos (5 mm diâmetro x 3 mm espessura) posicionados sobre uma placa de vidro. Os moldes foram levados à estufa, por 24 horas a 37 °C, para permitir que o material tomasse presa. Após esse período, as superfícies livres dos materiais foram lixadas, de forma a se obter corpos de prova planos e sem excessos, e então estes foram removidos dos moldes. Em seguida, os corpos de prova foram esterilizados por radiação UV-C em cabine de segurança

biológica por uma hora, em cada um dos lados. As amostras foram inseridas, individualmente, nos poços de uma placa de 24 poços, contendo 1 ml de meio DMEM (Sigma-Aldrich). A placa foi incubada em estufa a 37 °C por 24 horas para a obtenção dos eluatos (líquido com propriedades provenientes dos corpos de prova), os quais foram colocados em contato com as células previamente preparadas, conforme descrito a seguir.

A partir da suspensão celular obtida, conforme descrito previamente, foram semeados 200 µl (10⁴ células/ml) em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após, o meio de cultura foi removido e 200 µl dos eluatos foram inseridos aos poços (n = 4/grupo), permanecendo em contato com as células durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os eluatos foram removidos, as células lavadas por duas vezes com tampão PBS (Sigma-Aldrich), e então a citotoxicidade foi avaliada por meio da atividade metabólica dos FbLP, utilizando o ensaio colorimétrico MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) (Promega Biotecnologia do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Para isso, 20 µl do reagente MTS juntamente com 100 µl de meio DMEM foram adicionados aos poços contendo as células, permanecendo por 2 horas a 5% de CO₂ e 37 °C. Após, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 490 nm. Os valores de DO obtidos nos grupos experimentais foram calculados como a porcentagem metabólica comparada ao controle (FbLP tratados com meio DMEM). O experimento foi realizado em duplicata.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios dos halos de inibição e supressão, em mm, de UFCs/ml, e do percentual de atividade metabólica dos FbLP, foram analisados estatisticamente pelos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* Dunn. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS versão 21.0 (IBM, Armonk, NY, EUA).

RESULTADOS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os diâmetros médios dos halos de inibição e supressão, em mm, para cada grupo experimental, são demonstrados na Tabela 1. Halos significativamente superiores

foram evidenciados nos grupos G1 a G5 quando comparados ao controle com solução salina 0,85% ($p < 0,05$). Os grupos G1 a G5

apresentaram ação antimicrobiana similar, tanto quando comparados os halos de inibição, como de supressão ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão (DP) dos halos de inibição e supressão, em mm

Grupo	Diâmetro do halo (mm) ± DP	
	Halo de inibição	Halo de supressão
G1	11,77 ± 1,37 ^a	17,66 ± 3,92 ^a
G2	11,94 ± 1,40 ^a	16,88 ± 2,59 ^a
G3	11,72 ± 1,00 ^a	16,60 ± 2,72 ^a
G4	11,72 ± 1,25 ^a	16,77 ± 3,23 ^a
G5	11,72 ± 1,73 ^a	17,44 ± 2,69 ^a
Controle	0 ^b	0 ^b

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Nas Figuras 1 e 2 são mostrados os valores médios de células viáveis presentes no biofilme remanescente (UFC/biofilme) nos períodos imediato e residual, respectivamente, ou seja, células que permaneceram aderidas aos discos de dentina logo após o uso das medicações, e sete dias após a remoção das medicações. O grupo controle com solução salina apresentou um

valor médio de UFCs significativamente inferior no período de avaliação do efeito imediato ($1,14 \times 10^5 \pm 4,27 \times 10^4$), comparado ao período residual ($1,12 \times 10^8 \text{ UFC/mL} \pm 2,4 \times 10^7$) ($p < 0,001$). Todos os grupos experimentais foram capazes de erradicar o biofilme de *E. faecalis* no período imediato, e mantiveram a ação antibiofilme após o período de sete dias (efeito residual), demonstrando efetividade superior quando comparados ao controle ($p < 0,001$).

Figura 1 - Células viáveis remanescentes no biofilme de *E. faecalis* logo após o uso das medicações (efeito imediato)

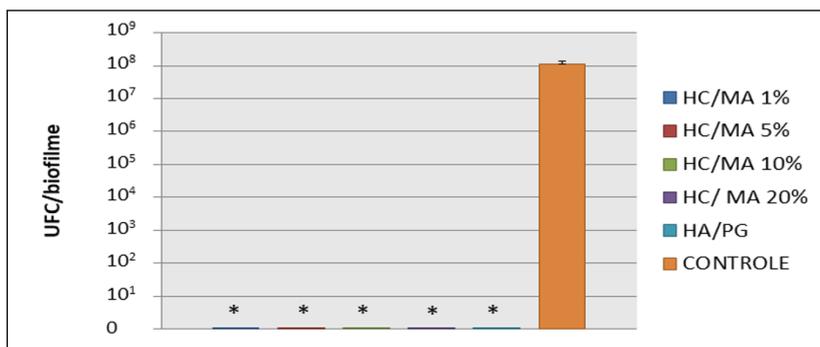
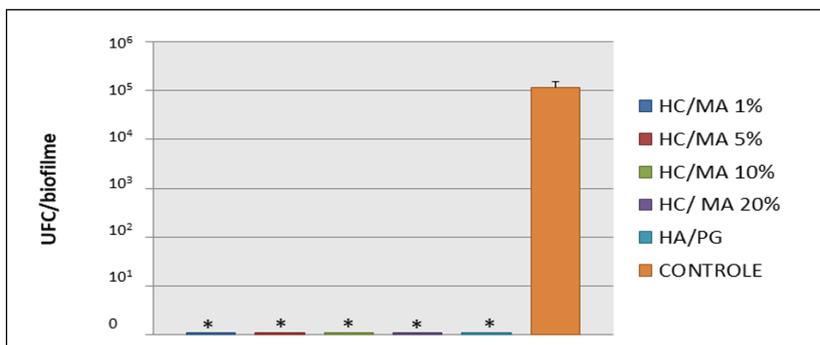


Figura 2 - Células viáveis remanescentes de *E. faecalis* após efeito antibiofilme residual promovido pelas medicações

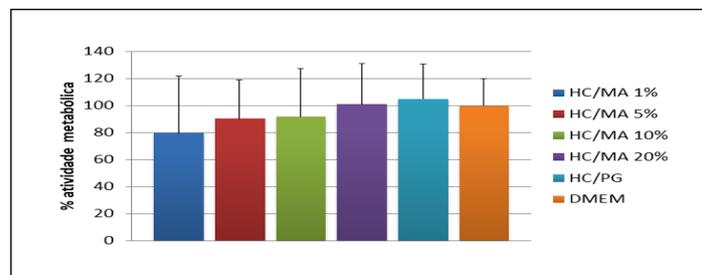


CITOTOXICIDADE AOS FBLP

Os valores médios percentuais da atividade metabólica dos FbLP, após 24 horas de contato com os eluatos correspondentes às diferentes medicações, são mostrados na Figura 3. De

G1 a G5, os percentuais de viabilidade foram, respectivamente, 79,79%, 90,41%, 91,87%, 101,03% e 104,98%. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais entre si ($p > 0,05$), assim como entre os grupos experimentais e o controle, DMEM ($p > 0,05$).

Figura 3 - Percentual de atividade metabólica dos FbLP após 24 horas de contato com os eluatos das medicações



DISCUSSÃO

Para que os REPs sejam bem-sucedidos, uma alternativa viável de tratamento é o uso de uma medicação intracanal biocompatível e com atividade antimicrobiana, possibilitando a obtenção de um ambiente favorável, livre de bactérias, que permitirá a proliferação das células-tronco²⁸. Ainda que o HC possua amplo espectro antimicrobiano contra diversos patógenos endodônticos²⁹, sua efetividade contra o *E. faecalis* não é consenso na literatura^{30,31}. A taxa de redução microbiana observada varia entre 24,25%³² e 100%³³. Sendo assim, variados estudos propõem associá-lo à diferentes veículos, a fim de potencializar a ação antimicrobiana^{30,34}.

No presente estudo, o uso do HC associado ao PG demonstrou excelente ação antimicrobiana e antibiofilme. Diferentemente de outras investigações que mostraram a permanência das bactérias nos túbulos dentinários^{35,36}, em regiões não alcançadas pela medicação³⁷, o uso do HC/PG em contato com o biofilme erradicou as células viáveis de *E. faecalis*, tanto no período imediato, como no residual³⁷. Achados de estudos prévios demonstram que um período de sete dias de ação do HC sobre o biofilme já seria suficiente para eliminar ou reduzir a quantidade de microrganismos e toxinas que possam ter permanecido após o preparo químico-mecânico^{38,39}. Um outro estudo, no qual a coleta microbiológica foi realizada após o período de sete dias da remoção do HC, também apontou diminuição significativa de UFCs³⁵.

Inicialmente, a associação de diferentes veículos às pastas à base de HC tinha como objetivo principal promover a dissociação dos íons

cálcio e hidroxila¹⁶. Com o surgimento dos óleos essenciais na odontologia novas alternativas de veículos em medicações intracanal vêm sendo testadas, com o intuito de potencializar a atividade antimicrobiana³⁰. Alguns óleos essenciais apresentam alta capacidade antimicrobiana, principalmente contra bactérias, em razão das suas características hidrofóbicas e lipofílicas⁴⁰, resultando na união, através de ligações químicas, aos lipídios presentes na membrana celular bacteriana, levando os microrganismos à morte⁴¹. Nesse estudo, quando o HC foi associado ao óleo essencial de MA, em variadas concentrações, foi observada ação antimicrobiana e antibiofilme 100% eficaz, indo ao encontro de achados prévios⁴⁰. Estudos semelhantes, porém avaliando outros óleos essenciais, relataram que estes compostos poderiam ser empregados como medicação intracanal, por inibir completamente o crescimento do biofilme de *E. faecalis* após 12 horas de contato⁴². A atividade antimicrobiana do óleo MA pode estar baseada na sua capacidade de induzir a perda de material intracelular bacteriano, causar alterações na homeostase e desequilíbrio hidroeletrólítico, resultando em uma perda da integridade e função da membrana celular⁴³.

Relatos na literatura indicam que a concentração terapêutica recomendada para o óleo de MA é de 2,5 a 5%, nas quais ele parece manter sua propriedade antibacteriana sem qualquer efeito tóxico aos tecidos adjacentes⁴⁴. Já foi demonstrado, porém, que níveis variáveis de citotoxicidade poderiam ser evidenciados em fibroblastos logo após 1 hora de exposição ao óleo MA 0,03%⁴⁵. Resultados também demonstram que quanto maior a concentração do material, maior a toxicidade⁴³. No entanto, no

presente estudo, o HC associado ao óleo, nas concentrações de 1% a 20%, foi biocompatível com os FbLP. Este achado vai ao encontro de outra investigação, na qual as concentrações do óleo MA que reduziram em 50% o crescimento celular de diversas células humanas, incluindo fibroblastos, após 24 horas, variaram em uma extensa faixa de 20 a 2700 µg/mg²³. Outro estudo, no qual diferentes concentrações do óleo foram testadas, também não demonstrou redução significativa na viabilidade celular⁴⁶.

Embora sem diferença significativa entre os grupos, é possível perceber que a medicação comumente empregada, HC/PG, assim como o HC/MA 20%, proporcionaram maior viabilidade celular quando comparadas ao controle DMEM. Segundo a *International Standard Organization* (ISO – 4730, 1996), o óleo essencial de MA deve possuir um padrão para poder ser comercializado, no que diz respeito às concentrações de seus principais compostos⁴⁷. O composto responsável pela ação antibacteriana, terpinen-4-ol, deve ser de, no mínimo 30%. Já o 1,8 cineol, componente potencialmente irritante à pele, deve ter uma concentração máxima de 15%⁴⁶.

A associação do HC com o óleo de MA, como medicação intracanal, pode assumir, futuramente, um papel promissor em endodontia regenerativa. A atividade antibiofilme evidenciada no presente estudo, necessária para promover a desinfecção de dentes imaturos e com polpa necrosada, pode fornecer condições para que as células-tronco da papila apical possam povoar a região, proliferar e sofrer diferenciação⁴⁸, permitindo o término da rizogênese. Soma-se, ainda, a propriedade de biocompatibilidade apresentada pela associação HC/MA, que não apenas influenciou, como também favoreceu a atividade metabólica celular. A otimização de protocolos clínicos de desinfecção e a neutralização de seus efeitos citotóxicos são essenciais para a obtenção de um ambiente propício ao processo regenerativo⁴⁹. Contudo, as propriedades do óleo de MA em associação ao HC ainda precisam ser aprofundadas, de forma a potencializar o uso da medicação. Além disso, as limitações do presente estudo *in vitro* precisam ser superadas, por meio do emprego de outros modelos de estudo mais próximos da realidade clínica, de testes contra biofilmes multiespécies e da avaliação da citotoxicidade frente às células-tronco.

CONCLUSÃO

Com base no presente estudo, pode-se concluir que a associação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, nas concentrações de 1%, 5%, 10% e 20%, ao hidróxido de cálcio foi tão eficiente quanto à associação com propilenoglicol, promovendo excelente ação antimicrobiana e capacidade de erradicar as células do biofilme de *E. faecalis* estabelecido na dentina do canal radicular de dentes bovinos. Além disso, não demonstrou citotoxicidade aos fibroblastos do ligamento periodontal.

AGRADECIMENTOS

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados a este estudo.

ORCID

Ana Clara Kuerten Gil  <https://orcid.org/0000-0001-5544-8310>

Taynara Santos Goulart  <https://orcid.org/0000-0002-9316-5343>

Emily Marques dos Reis  <https://orcid.org/0000-0002-1797-3197>

Luismar Marques Porto  <https://orcid.org/0000-0002-5777-5144>

Josiane de Almeida  <https://orcid.org/0000-0002-6120-5992>

REFERÊNCIAS

1. Diogenes A, Ruparel NB. Regenerative endodontic procedures: clinical outcomes. *Dent Clin North Am.* 2017;61(1):111-25.
2. Associação Americana de Endodontia. Scope of endodontics: regenerative endodontics [homepage na Internet]. AAE Position Statement; 2018. Disponível em: https://f3f142zs0k2w1kg84k5p9i1o-wpengine.netdna-ssl.com/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/07/2018AAE_Scope_of_Endo_Regenerative_Endodontics.pdf.
3. Nagata JY, Gomes BPF, Lima TFR, Murakami LS, Faria DE, Campos GR, et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod.* 2014;40:606-12.
4. Porter MLA, Munchow EA, Albuquerque MTP, Spolnik KJ, Hara AT, Bottino MC. Effects of novel 3-dimensional antibiotic-containing electrospun scaffolds on dentin discoloration. *J Endod.* 2016;42:106–12.

5. Chen MYH, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J.* 2012;45:294-305.
6. Asnaashari M, Ashraf H, Rahmati A, Amini N. A comparison between effect of photodynamic therapy by LED and calcium hydroxide therapy for root canal disinfection against *Enterococcus faecalis*: a randomized controlled trial. *Photodiagn Photodyn.* 2017;17:226-32.
7. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2007;40:2-10.
8. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Muwaquet-Rodríguez S, Albero-Monteagudo A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. *J Clin Exp Dent.* 2019;11:e185-93.
9. Jacobs JC, Troxel A, Ehrlich Y, Spolnik K, Bringas JS, Gregory RL, et al. Antibacterial effects of antimicrobials used in regenerative endodontics against biofilm bacteria obtained in mature and immature teeth with necrotic pulps. *J Endod.* 2017;43:575-9.
10. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28:689-93.
11. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J.* 2001;34:184-8.
12. Zand V, Mokhtari H, Hasani A, Jabbari G. Comparison of the penetration depth of conventional and nano-particle calcium hydroxide into dentinal tubules. *Iran Endod J.* 2017;3:366-70.
13. Peters LB, Van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J.* 2002;35:13-21.
14. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:282-90.
15. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, et al. Antibacterial properties of chitosan nanoparticles and propolis associated with calcium hydroxide against single- and multispecies biofilms: an in vitro and in situ study. *J Endod.* 2017;43:1332-6.
16. Giongo M, Santos RAM, Maciel SM, Fracasso MLC, Victorino FR. Analysis of pH and release of calcium of association between *Melaleuca alternifolia* oil and calcium hydroxide. *Rev Odont Unesp.* 2017;46:104-8
17. Lahijani MSS, Kateb HRR, Heady R, Yazdani D. The effect of German chamomile (*Marticairecutita* L.) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia* L.) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J.* 2006;39:190-5.
18. Carvalho NC, Guedes SAG, Albuquerque-Júnior RLC, Albuquerque DS, Souza Araújo AA, Paranhos LR, et al. Analysis of Aleo vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B.* 2018;178:348-54.
19. Yoshpe M, Einy S, Ruparel N, Lin S, Kaufman AY. Regenerative endodontics: a potential solution for external root resorption (Case Series). *J Endod.* 2020;46:192-9.
20. Galler KM, Krastl G, Simon S, Gorp GV, Meschi N, Vahedi B, et al. European Society of Endodontology position statement: revitalization procedures. *Int Endod J.* 2016;49:717-23.
21. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2012;38:1372-5.
22. Alasqah M, Khan SIR, Alfouzan K, Jamleh A. Regenerative endodontic management of an immature molar using calcium hydroxide and triple antibiotic paste: a two-year follow-up. *Case Rep Dent.* 2020;1-5.
23. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:616-25.
24. Homeyer DC, Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Murray CK, Wenke JC, et al. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. *Med Mycol.* 2015;53:285-94.
25. Nicolić MM, Jovanović KK, Marković TL, Marković DL, Gligorijević NN, Radulović SS, et al. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of *Citrus limon* L., *Piper nigrum* L. and *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69:1606.
26. Casarin M, Pazinato J, Santos RCV, Zanatta FB. *Melaleuca alternifolia* and its application against dental plaque and periodontal diseases: a systematic review. *Phytother Res.* 2018;32:230-42.

27. Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RA, Jiang LM, Van Der Sluis LW, Ten Cate JM, et al. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Endod.* 2009;35:1249–52.
28. Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55:5-11.
29. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci.* 2003;11:269-82.
30. Silva S, Alves N, Silva P, Vieira T, Maciel P, Castellano LR, et al. Antibacterial activity of *Rosmarinus Officinalis*, *Zingiber Officinale*, *Citrus Aurantium bergamia*, and *Copaifera officinalis* alone and in combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *Biomed Res Int.* 2019;1-7.
31. Asnaashari M, Eghbal MJ, Yaghmayi AS, Shokri M, AzariMarhabi S. Comparison of antibacterial effects of photodynamic therapy, modified triple antibiotic paste and calcium hydroxide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *J Lasers Med Sci.* 2019;10:S23.
32. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007;33:114-8.
33. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca (OH) 2. *J Endod.* 2005;31:359-63.
34. Raouf M, Khaleghi M, Siasar N, Mohammadalizadeh S, Haghani J, Amanpour S. Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Myrtus Communis* L. and *Eucalyptus Galbie* and their combination with calcium hydroxide powder against *Enterococcus Faecalis*. *J Dent (Shiraz).* 2019;20:195-202.
35. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012;45:311-6.
36. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo HR, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int End J.* 2004;37:311-9.
37. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34:399-405.
38. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000;26:751-5.
39. Siqueira Jr JF, Magalhães KM, Roças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007;33:667-72.
40. Abbaszadegan A, Dadolahi S, Gholami A, Moein MR, Hamedani S, Ghasemi Y, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of Cinnamomum zeylanicum, Calcium Hydroxide, and triple antibiotic paste as root canal dressing materials. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17:105–13.
41. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:564-82.
42. Gupta A, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Yadav A, Singh G, et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: a preliminary study. *Int Endod J.* 2013;46:775-83.
43. Cavalcanti YW, Pérez ALAL, Xavier GDR, Almeida LFD. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. *Rev Odontol UNESP.* 2011;40:208-14.
44. Monteiro DU, Azevedo MI, Weiblen C, Botton SA, Funk NL, Da Silva CB, et al. In vitro and ex vivo activity of *Melaleuca alternifolia* against protoscoleces of *Echinococcus ortleppi*. Cambridge University Press. 2017;144:214-9.
45. Soderberg TA, Johansson A, Gref R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *J Toxicol.* 1996;107:99-109.
46. Graziano TS, Calil CM, Sartoratto A, Franco GC, Groppo FC, Cogo-Müller K. In vitro effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on growth and production of volatile sulphur compounds by oral bacteria. *J Appl Oral Sci.* 2016;24:582-9.
47. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR, et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev Bras Plantas Med.* 2011;13:492-9.
48. Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia CO, Diogenes A, et al. Effect of bacterial biofilm on the osteogenic differentiation of stem cells of apical papilla. *J Endod.* 2017;43:916–22.
49. Widbiller M, Althumairy RI, Diogenes A. Direct and indirect effect of chlorhexidine on survival of stem cells from the apical papilla and its neutralization. *J Endod.* 2019;45:156-60.

Antibiofilm effect and cytotoxicity of calcium hydroxide associated with the *Melaleuca alternifolia* essential oil

Aim: To evaluate and compare the antimicrobial and antibiofilm effect, as well as the cytotoxicity of calcium hydroxide (CH) associated with the *Melaleuca alternifolia* (MA) essential oil, in different concentrations, and with propylene glycol.

Methods: The following medications composed the experimental groups: G1) CH/MA 1%; G2) CH/MA 5%; G3) CH/MA 10%; G4) CH/MA 20%; and G5) CH/PG. Saline solution and culture medium DMEM were used as a control in antimicrobial and cytotoxicity tests in human periodontal ligament fibroblasts (PDLF), respectively. The antimicrobial activity (n = 12) was evaluated by the disk-diffusion agar method. The immediate antibiofilm effect (n = 12) of the medications was evaluated for bacterial viability in 72 hours-biofilms of *E. faecalis*, formed on the dentin disc surface and treated for seven days with medications. After microbiological sampling of the remaining biofilm, the dentin discs were immersed in sterile culture medium and stored for another seven days, for analysis of the residual antibiofilm effect of the medications, when a new microbiological sampling was performed. PDLF viability was evaluated by MTS colorimetric assay (n = 9). The mean values of the inhibition halos, in mm, the colony forming units, and the metabolic cell activity percentage were analyzed by means of Kruskal-Wallis and *post hoc* Dunn ($\alpha = 5\%$) tests.

Results: All of the experimental medications presented higher antimicrobial and antibiofilm effects, when compared to the saline solution control ($p < 0.05$), and maintained the PDLF feasible, similar to the DMEM control ($p > 0.05$).

Conclusions: The association of the *Melaleuca alternifolia* essential oil, at concentrations of 1%, 5%, 10%, and 20%, with calcium hydroxide promoted an excellent antimicrobial and antibiofilm activity, and biocompatibility with fibroblasts, similarly to the association with propylene glycol.

Uniterms: Endodontics. *Enterococcus faecalis*. Fibroblasts. Tea tree oil. Oils, volatile.