



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RÔMULO AUGUSTO SOARES MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SUBSTANTIVIDADE
DE MICROEMULSÃO ASSOCIADA A AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA
PASSIVA PARA USO EM ENDODONTIA**

Teresina

2022

RÔMULO AUGUSTO SOARES MOURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia-PPGO da Universidade Federal do Piauí- UFPI, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Ciências Básicas e Biotecnologia Aplicadas à Odontologia

Orientador: Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho

Teresina

2022

RÔMULO AUGUSTO SOARES MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
SUBSTANTIVIDADE DE MICROEMULSÃO ASSOCIADA A
AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA PARA USO EM
ENDODONTIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia-PPGO da Universidade Federal do Piauí- UFPI, na área de Ciências Odontológicas, e linha de pesquisa Biociências e Materiais Odontológicos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho

Aprovada em 15 de julho de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho
Orientador(a)

Prof. Dr. Gláuber Campos Vale
Examinador interno

Prof^a. Dr^a. Maria Ângela Arêa Leão Ferraz
Examinador externo

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação em especial a minha mãe Maria das Graças Soares da Silva Moura (*in memoriam*), que enquanto esteve fisicamente comigo sempre me indicou e direcionou pelo caminho dos estudos. A meu pai João de Moura Neto pelo incentivo a fazer mestrado desde o dia que me formei. A minha esposa Najara Raquel Paz Rodrigues pela parceria de sempre e por ser porto quando as agitações apareciam. Ao meu filho Murilo Rodrigues Moura, que mesmo sem saber é minha fonte de motivação e alegria. A Ana Maria Araújo Costa Oliveira, minha mãe de outras vidas além desta. Aos meus irmãos e minha grande família de sangue e de afeto.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, pai misericordioso e todos os Santos de minha devoção que me deram forças quando achei que desistir fosse uma opção. Ao meu orientador André Luis Menezes Carvalho, que acreditou nesse projeto desde sua concepção, me guiou e liderou nessa jornada de muito estudo e dedicação. Agradeço aos demais professores do PPG Odontologia, pela dedicação em nos tornar pesquisadores, e por cada ensinamento compartilhado. Ao professor Dr. Patrick Veras Quelemes pelas conversas científicas que muito me ajudaram. Aos meus pais, minha esposa, meu filho, meus irmãos e demais familiares pela compreensão, apoio e suporte. Aos amigos do mestrado que tornaram mais leve essa complexa jornada. Aos amigos de longa data que compreenderam minha ausência. Aos amigos que me ajudaram durante a pesquisa: Almiro José de Sousa Neto, Janilson de Lima Alencar Modesto, Matheus Oliveira do Nascimento, Iluska Martins Pinheiro, Isione Oliveira, Marcondes Cavalcante Santana Neto, Irisvaldo Lima Guedes. Ao LADERMO, LIMAV, LACEM e UFPI pela disponibilização de suas estruturas. Ao Serviço Social do Comercio – SESC PI, Master Odontologia e demais localidades onde posso exercer minha profissão.

SUMÁRIO

	p.
RESUMO	06
ABSTRACT	07
1 REVISÃO DE LITERATURA	08
1.1 ENDODONTIA DESAFIOS E AVANÇOS	08
1.2 FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA A ENDODONTIA.....	11
1.3 IRRIGAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA (PUI) X SANITIZAÇÃO DOS CONDUTOS	13
1.4 SOLUÇÕES IRRIGADORAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 INTRODUÇÃO	21
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICE A	53

RESUMO

Introdução: O controle da microbiota patogênica tem papel fundamental na terapia dos canais radiculares. A utilização de solução irrigadora com propriedades antimicrobianas aliadas a terapias adjuvantes exerce papel importante durante o preparo biomecânico. **Objetivo:** avaliar o efeito da associação entre irrigação ultrassônica passiva à microemulsão contendo clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) em relação à atividade antimicrobiana e à substantividade. **Método:** Os grupos de estudo foram divididos em microemulsão contendo clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) (Grupo 1), gel comercial de clorexidina a 2% (Grupo 2). Cada grupo foi subdividido em A (com agitação ultrassônica) e B (sem agitação ultrassônica), e testados nas condições estabelecidas por meio de um planejamento fatorial 2³. Os parâmetros utilizados para a utilização do ultrassom foram a potência de ativação, o tempo e a quantidade de ciclos de ativação. Estes foram utilizados nos ensaios de liberação *in vitro* e de substantividade, avaliação da atividade antimicrobiana (em relação à *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*) por meio de testes de concentração inibitória mínima e difusão em placa de ágar Mueller Hinton. **Resultados:** O uso da ativação ultrassônica influenciou ($p < 0,05$) no ensaio de substantividade, onde a quantidade de clorexidina presente em dentina quando a agitação ultrassônica foi utilizada na microemulsão aumentou em 80%. Em relação a atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* houve similaridade ao comparar a microemulsão com o gel comercial de clorexidina a 2%. Ao avaliar ação antifúngica por meio do teste de difusão em placas de Ágar Mueller Hinton a microemulsão obteve resultados superiores ao da clorexidina comercial em gel a 2% ($p < 0,05$). **Conclusão:** O uso do ultrassom influencia na substantividade da microemulsão. A microemulsão tem potencial promissor enquanto solução irrigadora dos canais radiculares devido a paridade em relação a atividade antimicrobiana e superioridade quanto a ação antifúngica.

Palavras chave: Agentes antimicrobianos. Nanotecnologia. Clorexidina. Tratamento endodôntico. Óleos essenciais.

ABSTRACT

Introduction: Pathogenic microbiota control plays a fundamental role in endodontics. The use of irrigating solution with antimicrobial properties combined with adjuvant therapies does an important role during biomechanical preparation.

Objectives: to evaluate the effect of the association between Passive Ultrasonic Irrigation and microemulsion containing chlorhexidine and rosemary pepper essential oil (*Lippia sidoides*) in relation to antimicrobial activity and substantivity.

Methods: Study groups were divided into microemulsion containing chlorhexidine and rosemary pepper essential oil (*Lippia sidoides*) (Group 1), commercial 2% chlorhexidine gel (Group 2). Each group was subdivided into A (with ultrasonic agitation) and B (without ultrasonic agitation), and tested under the conditions established through 2³ factorial design. The parameters used for the use of ultrasound were activation power, time and number of cycles. These were used in in vitro release and substantivity assays, evaluation of antimicrobial activity by means of minimal inhibitory concentration tests and diffusion in Mueller Hinton agar plate. **Results:** The use of ultrasonic activation influenced ($p < 0.05$) in the substantivity assay, where the amount of chlorhexidine present in dentin when using the microemulsion increased by 80%. There was no statistical difference regarding the antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* ($p > 0.05$) when comparing the microemulsion with the commercial 2% chlorhexidine gel. When evaluating antifungal action through the diffusion test on Mueller Hinton Agar plates, the microemulsion obtained better results than commercial chlorhexidine in 2% gel. **Conclusions:** The use of ultrasound influences the substantivity of the microemulsion. The microemulsion has promising potential as an irrigating solution for root canals due to parity in relation to antimicrobial activity and superiority in terms of antifungal action.

Keywords: Antimicrobial agents. Nanotechnology. Chlorhexidine. Endodontic treatment. Essential oils.

1 REVISÃO DE LITERATURA

Foi realizada pesquisa bibliográfica na base de dados PUBMED por trabalhos publicados nos últimos dez anos e escritos em língua inglesa. Foram utilizados os descritores “Endodontic treatment”, “ultrasonic” or “chlorhexidine”, “intracanal”, “enterococcus” e “antibiofilm”. Para a revisão de literatura foram selecionados artigos relacionados à temática da pesquisa, seguindo as normas do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPI.

1.1 Endodontia: desafios e avanços

O conhecimento da morfologia dentária é de suma importância para o sucesso do tratamento endodôntico, porque influencia diretamente na escolha dos instrumentais a serem utilizados no tratamento dos condutos radiculares. A diafanização, microscopia óptica, radiografias em duas dimensões, microscopia eletrônica de varredura, ou imagens radiográficas em três dimensões geradas pela utilização de microtomógrafo ou tomógrafo cone beam tem respaldado os estudos sobre a anatomia dentária (HABERTHÜR; HLUSHCHUK; WOLF, 2021).

Martins *et al.* (2019) com o uso de estudos sobre a anatomia dentária e a análise estatística sobre a prevalência de características comuns a cada grupo de dentes como: a quantidade de raízes, de condutos radiculares, forma e espessura dessas, presença de istmos, canais secundários, delta apicais, pôde evidenciar que essas características podem variar de acordo com questões étnicas e sociodemográficas. Isso demonstra que são de fundamentais importância para um planejamento sobre o tratamento dos canais radiculares e as eventuais variações que irão demandar abordagens diferenciadas para sanar questões relativas ao desafio microbiológico imposto pelas patologias pulpares e periapicais.

Para realizar o preparo biomecânico dos canais radiculares, podem ser utilizadas limas manuais ou mecanizadas, em associação a uma solução irrigadora que apresentem características como: atividade antimicrobiana, favorecer a ação mecânica das limas quanto a sua movimentação dentro dos condutos, ao reduzir o atrito entre essas e a superfície dentinária (MENECHIN *et al.*, 2006).

As limas endodônticas tem evoluído principalmente quanto a composição das ligas metálicas que as compõem, tornando-as mais maleáveis

e conseqüentemente adaptáveis ao percurso que envolve entrada dos condutos radiculares até o ápice dentário, com melhor poder de corte e resistência à fratura (LOKHANDE; BALAGURU, 2020)

Mesmo com o avanço tecnológico, ainda não há um instrumento ou equipamento capaz de preparar os condutos de forma que a superfície dentinária infectada seja removida por completo devido à sua ação mecânica, o que também ocorre com o biofilme que está depositado sob essa região (TIEN *et al.*, 2020). Com isso, é indispensável a ação das soluções irrigadoras, porque devido a sua fluidez conseguem embeber as superfícies internas dos condutos, agindo de forma química sobre o biofilme provocando sua ruptura, com efeito bactericida e ou bacteriostático, bem como a limpeza dos condutos (SHAWLI *et al.*, 2020).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado endodontia. Tem como principais características: ação antimicrobiana, capacidade de dissolver e eliminar tecidos orgânicos e debris dentinários. Possui como desvantagens a possibilidade de causar reações alérgicas, danos aos tecidos periapicais e toxicidade, segundo Demenech *et al.* (2021). Em relação a toxicidade, tem se utilizado o modelo de Hen e o estudo conduzido por Demenech *et al.* (2021) demonstrou que tanto o hipoclorito nas concentrações estudadas (8,25%, 5,25% e 2,5%) quanto a clorexidina a 2% podem apresentar reações características de toxicidade, como a hiperemia, coagulações, reações inflamatórias e presença de áreas necróticas.

A citotoxicidade do hipoclorito de sódio (FIDALGO *et al.*, 2009), bem como a existência dos casos de resistência bacteriana (TELES *et al.*, 2021), tem incentivado a autores (como os descritos por BORZINI *et al.* (2016)) a desenvolver substâncias que possuam potencial antibacteriano, ação fungicida e efeitos residuais que possam ser aplicados em odontologia.

Alternativas tem sido buscada para substituírem as soluções de hipoclorito de sódio. Entre elas tem se destacado o Digluconato de Clorexidina a 2%. Seu uso foi amplamente divulgado para fins odontológicos em meados dos anos 1970 a partir da divulgação dos estudos de Mackenzie *et al.* (1976), e tem sido o material de escolha quando utilizado para antissepsia oral. Em endodontia é indicado como medicação intracanal e solução irrigadora, devido suas propriedades antimicrobianas, amplo espectro de ação e atividade antibacteriana residual. Na formulação em gel, os detritos gerados ficam

suspensos na solução e evitam que haja a formação de tampão dentinário e facilitam sua remoção(GOMES *et al.*, 2013).

Borzini *et al.*,2016 realizaram uma revisão integrativa sobre o efeito de quimioterápicos e extrato de plantas em biofilme de *Enterococcus faecalis*, grupo bacteriano frequentemente encontrado em casos de reinfecção ou contaminação persistente. Estudos *in vitro* tem demonstrado que o potencial antibacteriano de alguns extratos ou óleos essenciais tem sido promissor, a exemplo disso a *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) apresentou efeito anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano e ação imunomoduladora (HERRERA *et al.*, 2010). *Schinus terebintifolius Raddi* (aroeira-da-praia) apresentou ação anti-inflamatória e bactericida em doses agudas e em doses subagudas não produziram efeitos tóxicos em ratos wistar (DE BRITO COSTA *et al.*, 2012). *Syderoxylum obtusifolium* Roem & Schult (quixabeira) , planta encontrada no nordeste brasileiro, tem seu uso indicado para infecções orais e apresentaram ação efetiva contra *Enterococcus faecalis* (SANTOS *et al.*, 2009).

Ainda no contexto de produtos naturais, tem-se a evidência da ação da própolis enquanto agente bactericida, supostamente relacionada a presença de flavonóides, e anti-inflamatório (KOO *et al.*, 2000). Em relação ao gengibre (*Zingiber officinale*), percebeu-se a ação antibiótica em bactérias anaeróbicas, e o extrato de gengibre apresentou atuação similar ao hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina a 2% quando foram testados como soluções irrigadoras para o preparo biomecânico em dentes extraídos e contaminados com *Enterococcus faecalis* (MAEKAWA *et al.*, 2013). O óleo de mamona (*Ricinus communis*) também tem sido sugerido como solução irrigadora, e estudos *in vitro* tem demonstrado ação contra *Escherichia coli* e *E. faecalis* (MENEZHIN *et al.*, 2006).

Outros meios sugeridos no combate às bactérias patogênicas são os óleos essenciais derivados da flora das mais variadas regiões, usadas empiricamente ao longo da história médica das civilizações onde essa vegetação é encontrada (MARTÍNEZ *et al.*, 2021). O óleo essencial de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) tem indicação como bactericida de uso tópico por não se inativar ao ser diluído e nem se alterar na presença de matéria orgânica, e ao eugenol presente em suas moléculas como principal composto tem se justificado tal propriedade (CHAIEB *et al.*, 2008).

Dorman; Deans (2000) testaram a ação de 8 tipos de óleos essenciais contra 25 tipos de bactérias. Entre eles, destacam-se os derivados de cravinho (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*). O óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) tem sido objeto de estudo em Odontologia especialmente por sua atividade comprovada contra bactérias da cavidade bucal (BOTELHO *et al.*, 2016). Avaliações *in vivo* de formulações em gel, bochecho e dentifrício comprovaram por meio de parâmetros salivares a ação antibacteriana dos constituintes da *Lippia sidoides*: Timol e Carvacrol, na redução de *Streptococcus mutans* em crianças com a presença de atividade de cárie dentária (LOBO *et al.*, 2014). Estes possuem atividade contra todos os microrganismos presentes na cavidade bucal (BOTELHO *et al.*, 2007).

1.2 Formulações nanoestruturadas: uma nova perspectiva para a endodontia

Microemulsões (MEs) são sistemas com estabilidade termodinâmica, com transparência óptica, isotrópicos e de viscosidade baixa, formados por gotículas em escala nanométrica, dispersas em uma fase contínua de um solvente imiscível com a fase dispersa. Em sua formação estão presentes: água, um solvente hidrofóbico que é chamado de "óleo", um tensoativo e, frequentemente, também um co-tensoativo, (DA SILVA *et al.*, 2015). Também apresentam como características a facilidade e baixo custo de preparação, bem como alta biodisponibilidade dos fármacos utilizados (MISTRALETTI *et al.*, 2019).

Resende *et al.*(2008) demonstram que microemulsões apresentam propriedades diferenciadas que as tornam particularmente interessantes como moduladoras da liberação de fármacos, principalmente pelas vias oral e tópica. Ainda pontuam que elas se comportam como fluidos pseudoplásticos, não-newtonianos, onde a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não é uma constante o que as tornam adequadas para aplicações farmacêuticas e cosméticas.

Sieniawska *et al.*(2019) formularam microemulsões contendo, separadamente, óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), hortelã (*Mentha x piperita* L. 'Multimentha') e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e as avaliaram em relação à citotoxicidade e propriedades antioxidantes. As

microemulsões apresentaram melhor atividade antioxidante em relação aos óleos essenciais. O aumento na atividade foi de 13,96% em relação ao óleo essencial de eucalipto, 22,25% quando comparado ao de hortelã e elevou-se em 45,60% relacionado ao óleo essencial de citronela. As microemulsões ofereceram boa solubilidade aos constituintes do óleo essencial e reduziram sua volatilidade em meio de cultura.

A forma de apresentação das substâncias utilizadas para irrigação dos canais radiculares também tem sido objeto de alguns estudos, com destaque para opções que sejam mais eficazes quanto a sua ação. Ao utilizar clorexidina em formulações nanoestruturadas, Abdelmonem *et al.*(2019) conseguiram que a solução irrigadora pudesse ter uma maior penetrabilidade nos túbulos dentinários quando comparada ao gel tradicionalmente utilizado na rotina clínica.

Haseeb *et al.* (2016), sintetizaram e caracterizaram uma formulação contendo nanopartículas de clorexidina encapsuladas para ser utilizada como uma solução irrigadora de canais radiculares com liberação prolongada. Sua ação antimicrobiana foi testada *in vitro* em *Enterococcus faecalis*, por meio da mensuração do diâmetro do halo de inibição bacteriano. Pode-se observar que as nanopartículas contendo clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana por até 21 dias, evidenciando que a nanotecnologia pode modular a biodisponibilidade, liberação do composto químico, substantividade e ação bactericida.

Abdelmonem *et al.* (2019) desenvolveram uma nanoemulsão contendo hidróclorido de clorexidina com o objetivo de melhorar a sua capacidade de penetração, sanitização e efeito antibacteriano. Para isso compararam a formulação nanoestruturada nas concentrações de 0,75% e 1,6% com o gel tradicional de clorexidina a 2% em relação à penetrabilidade e limpeza, avaliadas em microscopia eletrônica de varredura. Avaliaram também o efeito bactericida por meio da mensuração de unidades formadoras de colônia. A nanoemulsão a 1,6% apresentou os melhores resultados ($p < 0,05$) frente às propriedades testadas. E assim, mostrou-se promissora quanto a sua utilização como solução irrigadora em canais radiculares.

Santana Neto *et al.* (2020) desenvolveram uma microemulsão contendo digluconato de clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia*

sidoides). Para avaliar sua atividade antimicrobiana realizaram um estudo *in vitro* em modelo de dentina bovina, contaminada com *Enterococcus faecalis*. O resultado obtido foi similar ao encontrado quando se utilizou o gel comercial de digluconato de clorexidina a 2% como comparativo do estudo. Entretanto, pôde se observar que a formulação nanoestruturada apresentou valores relacionados a sua substantividade um potencial de ação quatro vezes maior quanto à solução irrigadora tradicionalmente utilizada sob a forma de gel.

1.3 Irrigação ultrassônica passiva (PUI) x Sanitização dos condutos

Joy *et al.* (2015) com o objetivo de avaliar a influência da técnica de irrigação na remoção do biofilme dentinário dos canais radiculares realizaram um estudo *ex vivo*. Foram utilizados 40 incisivos centrais superiores (com raízes retas e um conduto radicular), divididos em dois grupos a serem testados: irrigação convencional e irrigação ultrassônica passiva, e estes subdivididos em quatro subgrupos dependendo da espessura e conicidade do conduto preparado (limas de diâmetro apical 20 e 40 e conicidade 0,04 e 0,08). A média de biofilme residual foi maior no terço coronário e diminuiu com o aumento do calibre do instrumento utilizado para preparar os condutos. A redução também pode ser vista com o aumento do taper das limas utilizadas, assim como com o volume de solução irrigadora. O estudo aponta que a utilização de PUI se mostrou eficaz na remoção de biofilme.

Cherian; Gehlot; Manjunath (2016) por meio de um estudo *in vitro* avaliaram se a irrigação ultrassônica passiva influenciava o efeito antimicrobiano da clorexidina e dihidro octanidina. Dentes unirradiculares foram preparados, utilizando alargadores de gates glidden do tamanho 1 ao 3 no terço coronário, e a região apical instrumentada até a lima Kerr nº50. O hipoclorito de sódio a 1% foi a solução irrigadora utilizada. Os dentes foram esterilizados, em seguida postos em meio de cultura contendo *Enterococcus faecalis* para formarem um biofilme sobre a superfície dentinária. Foram utilizados para o estudo quatro grupos contendo 12 dentes, onde cada formulação foi testada com e sem ativação ultrassônica, e o raio de ação das formulações foi mensurado por meio de microscopia eletrônica de varredura. Houve associação entre o uso da ativação ultrassônica e ampliação do efeito antimicrobiano. O uso da irrigação

passiva reduziu por completo a carga bacteriana a uma distância de 200µm, e consideravelmente a 400µm.

De Vasconcelos *et al.* (2017) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar o efeito da irrigação ultrassônica passiva (PUI) na desinfecção dos canais radiculares. Para isso, utilizaram 84 incisivos inferiores divididos em seis grupos. Os dentes foram preparados com três sistemas mecanizados diferentes, com e sem a utilização do ultrassom, Biorace®, ProTaper Universal® e Reciproc®. O efeito desinfetante foi mensurado por meio de cones de papel utilizados para coletar o conteúdo bacteriano após instrumentação, estes foram inseridos em meio de cultura contendo BHI (Brain Heart Infusion), com trocas sucessivas por cinco dias, para ao final serem contabilizadas as formações de colônias bacterianas. Os grupos onde a PUI foi utilizada apresentaram redução na contagem de bactérias quando comparados ao grupo controle positivo. O uso do ultrassom, independentemente do sistema mecanizado, mostrou-se eficaz como terapia adjuvante na desinfecção dos canais radiculares.

Căpută *et al.* (2019) realizaram uma revisão sistemática para conseguir evidências sobre: a limpeza e desinfecção dos canais radiculares, e a cicatrização periapical quando se utiliza PUI ou a irrigação manual convencional, nos tratamentos de infecções endodônticas primárias de dentes permanentes com ápice fechado. De um conjunto de 1966 artigos pré selecionados, 48 foram recomendados para leitura completa. Desses artigos, 20 tratavam sobre a remoção de tecido mineralizado e debris dentinários, 19 sobre efeito antimicrobiano, oito sobre a remoção de remanescentes pulpares e um sobre cicatrização periapical. O nível de evidências foi considerado baixo e nenhuma recomendação forte, para indicar uma das técnicas, pode ser estabelecida.

Silva *et al.* (2019) com o objetivo de evidenciar a influência da irrigação ultrassônica passiva (PUI) na cicatrização da região periapical e desinfecção do canal radicular, realizaram uma revisão sistemática. Buscaram nas bases de dados artigos relacionados ao tema, e ao final do processo de seleção, três estudos preencheram o critério de inclusão: ser ensaio clínico randomizado que comparasse as técnicas de irrigação ultrassônica (PUI) e manual convencional (NAI). Não existem evidências que preconizem o uso de PUI ao invés de NAI com o intuito de melhorar a cicatrização periapical ou a desinfecção bacteriana.

Com o objetivo de identificar se ao ser utilizada a irrigação ultrassônica passiva ou a irrigação manual convencional, haverá diferença quanto à desinfecção dos condutos radiculares, Moreira *et al.* (2019) publicaram uma revisão sistemática com metanálise. A busca nas bases de dados pré selecionou 3.414 artigos, e desse montante nove puderam permanecer no estudo e passaram por um processo de avaliação crítica. Ao analisar os três artigos que puderam fazer parte da metanálise, identificaram que não houve associação entre a técnica de irrigação e melhores resultados na desinfecção dos canais radiculares.

Orozco *et al.* (2020) por meio de um ensaio clínico randomizado avaliaram a eficácia da ativação ultrassônica passiva enquanto protocolo de irrigação final, na descontaminação dos canais radiculares com infecção endodôntica primária. Dois grupos fizeram parte do estudo: um utilizando irrigação manual e outro com ativação ultrassônica. Um total de dez dentes unirradiculares, com necrose pulpar e periodontite apical, após serem instrumentados, foram alocados em cada grupo. Foram realizadas três coletas para verificarem as bactérias presentes nos condutos: uma antes e outra após a instrumentação, e a terceira após o uso de EDTA a 17%. Considerando a média de redução de bactérias viáveis para cultura, houve associação entre o uso do ultrassom e a queda do número de bactérias no conduto ($p < 0,05$). A utilização da ativação ultrassônica passiva se mostrou eficaz na redução do número de bactérias e consequente desinfecção dos canais radiculares.

1.4 Soluções irrigadoras x atividade antimicrobiana

Gonçalves *et al.* (2016) realizaram uma revisão sistemática para avaliar o efeito das soluções irrigadoras na desinfecção de canais radiculares. Após busca em base de dados utilizando o parâmetro: ensaio clínico randomizado ou não randomizado que comparasse hipoclorito de sódio com clorexidina, um total de cinco artigos fizeram parte do estudo. Concluíram que ambas possuem propriedades desinfetantes e que não há evidências para indicar uma das soluções para o tratamento endodôntico de dentes unirradiculares.

O objetivo de identificar se há associação entre o uso de clorexidina ou hipoclorito de sódio na redução dos níveis de endotoxina após o preparo dos

condutos de dentes com infecção primária motivou Neelakantan *et al.* (2019) a realizar uma revisão sistemática com metanálise. Após busca por ensaios clínicos (randomizados e não randomizados) publicados nas bases de dados indexadas, 348 artigos foram selecionados, a priori, e após leitura completa, utilizaram quatro artigos para o estudo. Ao executar a metanálise, identificaram associação entre o uso de soluções de hipoclorito de sódio e a redução de endotoxinas no canal radicular em dentes com infecção endodôntica primária.

Ruksakiet *et al.* (2020) realizaram uma revisão sistemática com metanálise com objetivo de discutir sobre a eficácia antimicrobiana na desinfecção de canais radiculares das soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina enquanto irrigantes de canais radiculares em ensaios clínicos randomizados. Em uma busca primária encontraram 2.110 artigos e ao final do processo de refinamento de seleção, oito artigos integraram o estudo com metanálise. A recomendação obtida é que ambas possuem efeito antimicrobiano, reduzindo a carga bacteriana nos condutos tratados endodonticamente.

Reddy *et al.* (2020) investigaram a capacidade antifúngica de solução irrigadora a base de octenidina (Octenisept) comparada ao hipoclorito de sódio associado ao edta e clotrimazol, com tampão de fosfato como grupo controle. Para tanto, valeram-se de dois grupos principais: jovens e idosos, subdivididos para cada substância testada. Houve associação entre o uso de Octenisept em dentinas jovens e a ação antifúngica, contudo, entre as substâncias testadas não houve diferença estatística mesmo com melhores resultados para a nova solução.

Awawdeh; Jamleh; Al Beitawi, 2018 estudaram, *in vitro*, a atividade antifúngica de solução contendo Propolis a 30%, mistura contendo doxiciclina, ácido cítrico e detergente (MTAD), clorexidina 2%, hipoclorito de sódio a 3% e solução salina na presença ou ausência de *smear layer*. Cilindros de 9mm obtidos a partir de raízes de dentes humanos foram preparados, contaminados com *Candida albicans* e submetidos a ação das formulações testadas. Não houve ação antifúngica da solução salina e MTAD, e as demais substâncias apresentaram atividade antifúngica, porém sem diferença estatística entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMONEM, Rehab *et al.* Formulation and characterization of chlorhexidine HCL nanoemulsion as a promising antibacterial root canal irrigant: In-vitro and ex-vivo studies. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 14, p. 4697–4708, 2019.

AWAWDEH, Lama; JAMLEH, Ahmed; AL BEITAWI, Maha. The antifungal effect of propolis endodontic irrigant with three other irrigation solutions in presence and absence of smear layer: An in vitro study. **Iranian Endodontic Journal**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 234–239, 2018.

BORZINI, Letizia *et al.* Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. **The Open Dentistry Journal**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 692–703, 2016.

BOTELHO, Marco Antonio *et al.* Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: A double-blinded randomized controlled trial. **Journal of Applied Oral Science**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 175–180, 2007.

BOTELHO, Marco A. *et al.* Nanotechnology in Phytotherapy: Antiinflammatory Effect of a Nanostructured Thymol Gel from *Lippia sidoides* in Acute Periodontitis in Rats. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 152–159, 2016.

CĂPUTĂ, Petruța E. *et al.* Ultrasonic Irrigant Activation during Root Canal Treatment: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 31-44.e13, 2019.

CHAIEB, Kamel *et al.* Inhibition of cholinesterase and amyloid- β aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 544–549, 2008. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117934759/abstract>.

CHERIAN, Bastin; GEHLOT, Paras Mull; MANJUNATH, Mysore Krishnaswamy. Comparison of the antimicrobial efficacy of octenidine dihydrochloride and chlorhexidine with and without passive ultrasonic irrigation - An invitro study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. ZC71–ZC77, 2016.

DA SILVA, José Dilson F. *et al.* Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 1196–1206, 2015.

DE BRITO COSTA, Edja Maria Melo *et al.* In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. **Brazilian Oral Research**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 215–221, 2012.

DE VASCONCELOS, Layla Reginna Silva Munhoz *et al.* Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. **Journal of Applied Oral Science**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 477–482, 2017.

DEMENECH, Luciana S. *et al.* Biocompatibility of the 8.25% sodium hypochlorite irrigant solution in endodontics: An in vivo study. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 84, n. 7, p. 1506–1512, 2021.

DEMENECH, Luciana Stadler *et al.* Postoperative Pain after Endodontic Treatment under Irrigation with 8.25% Sodium Hypochlorite and Other Solutions: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 696–704, 2021.

DORMAN, H. J.D.; DEANS, Stanley G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

FIDALGO, T K *et al.* Citotoxicidade de diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio sobre osteoblastos humanos. **Rgo**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 317–321, 2009.

GOMES, Brenda P.F.A. *et al.* Chlorhexidine in endodontics. **Brazilian Dental Journal**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 89–102, 2013.

GONÇALVES, Lucio Souza *et al.* The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: A systematic review of clinical trials. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 527–532, 2016.

HABERTHÜR, David; HLUSHCHUK, Ruslan; WOLF, Thomas Gerhard. Automated segmentation and description of the internal morphology of human permanent teeth by means of micro-CT. **BMC Oral Health**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01551-x>.

HASEEB, Ridwan *et al.* Synthesis and characterization of new chlorhexidine-containing nanoparticles for root canal disinfection. **Materials**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2016.

HERRERA, Daniel R. *et al.* In vitro antimicrobial activity of phytotherapeutic *Uncaria tomentosa* against endodontic pathogens. **Journal of oral science**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 473–476, 2010.

JOY, Joseph *et al.* Bacterial Biofilm Removal Using Static and Passive Ultrasonic Irrigation. **Journal of international oral health : JIOH**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 42–47, 2015.

KOO, H. *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 141–148, 2000.

LOBO, Patrícia Leal Dantas *et al.* The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 21, n. 8–9, p. 1043–1047, 2014.

LOKHANDE, Pravin R.; BALAGURU, S. A mathematical model for root canal preparation using Endodontic file. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 396–400, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.09.002>.

MAEKAWA, Lilian Eiko *et al.* Microorganisms and Endotoxins in Root Canals. **J Apol Oral Sci**, [s. l.], v. 21, n. Clx, p. 25–31, 2013.

MACKENZIE, I.C., NUKI, K., LÖUE, H. AND RINDOM SCHIÖUTT, C. Two years oral use of chlorhexidine in man. **Journal of Periodontal Research**, 11: 165–171, 1976. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1976.tb00065.x>

MARTÍNEZ, Andrés *et al.* **Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of escherichia coli and staphylococcus aureus.** [S. l.: s. n.], 2021.

MARTINS, Jorge N.R. *et al.* Prevalence studies on root canal anatomy using cone-beam computed tomographic Imaging: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 372-386.e4, 2019.

MENEGHIN, Marcos Pozzetti *et al.* Morphologic and morphometric analysis of the root canal apical third cleaning after biomechanical and 1 % NaOCl as irrigating solutions. **Journal of Applied Oral Science** [s. l.], v. 14, n. 3, p. 178–182, 2006.

MISTRALETTI, Giovanni *et al.* Different routes and formulations of melatonin in critically ill patients. A pharmacokinetic randomized study. **Clinical Endocrinology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 209–218, 2019.

MOREIRA, Rafaela Nogueira *et al.* Passive ultrasonic irrigation in root canal: systematic review and meta-analysis. **Acta Odontologica Scandinavica**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 55–60, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1499960>.

NEELAKANTAN, P. *et al.* Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 19–27, 2019.

OROZCO, Esteban Isai Flores *et al.* Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: A randomized clinical trial. **Journal of Applied Oral Science**, [s. l.], v. 28, n. November, 2020.

REDDY, N. Bharath Naga *et al.* Comparative Evaluation of Antifungal Activity of Octenidine: An In Vitro Confocal Laser Study. **Journal of Contemporary Dental Practice**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 905–909, 2020.

RESENDE, Kélia Xavier *et al.* Effect of cosurfactant on the supramolecular structure and physicochemical properties of non-ionic biocompatible microemulsions. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 35–42, 2008.

RUKSAKIET, Kasidid *et al.* Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Endodontics**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.05.002>.

SANTANA NETO, Marcondes Cavalcante *et al.* Development of Chlorhexidine Digluconate and Lippia sidoides Essential Oil Loaded in Microemulsion for Disinfection of Dental Root Canals: Substantivity Profile and Antimicrobial Activity. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 21, n. 8, 2020.

SANTOS, Esther Bandeira *et al.* Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, n. 1b, p. 321–324, 2009.

SHAWLI, Hassan *et al.* Nanobubble-Enhanced Antimicrobial Agents: A Promising Approach for Regenerative Endodontics. **Journal of Endodontics**, [s. l.], 2020.

l.], v. 46, n. 9, p. 1248–1255, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.002>.

SIENIAWSKA, Elwira *et al.* Microemulsions of essential oils – Increase of solubility and antioxidant activity or cytotoxicity?. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 129, n. April, p. 115–124, 2019.

SILVA, Emmanuel J.N.L. *et al.* Effectiveness of passive ultrasonic irrigation on periapical healing and root canal disinfection: a systematic review. **British Dental Journal**, [s. l.], v. 227, n. 3, p. 228–234, 2019.

TELES, Flavia R.F. *et al.* Bacterial resistance to minocycline after adjunctive minocycline microspheres during periodontal maintenance: A randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 92, n. 9, p. 1222–1231, 2021.

TIEN, Michelle *et al.* Comparative Study of Four Endodontic File Systems to Assess Changes in Working Length during Root Canal Instrumentation and the Effect of Canal Curvature on Working Length Change. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 110–115, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.10.004>.

2 DESENVOLVIMENTO

INTRODUÇÃO

O controle da infecção em endodontia é desafiador, devido as particularidades anatômicas do sistema de canais radiculares como a presença de istmos, ramificações e curvaturas¹. Estes podem não sofrer a ação dos instrumentais e da solução irrigadora utilizados no preparo biomecânico². A microbiota endodôntica é plural, composta por microrganismos gram-positivos, gram-negativos, aeróbicos e principalmente por anaeróbicos, o que requer da solução irrigadora uma amplo espectro de ação³.

O preparo biomecânico necessita de uma solução irrigadora que, entre outras propriedades, atue como agente antimicrobiano, e facilite a ação mecânica das limas ao agir como lubrificante dos sistemas de canais radiculares⁴. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução com maior utilização na pratica endodôntica, devido sua capacidade de dissolver tecidos, amplo espectro de ação antibacteriana, no entanto a sua citotoxicidade é evidenciada e com isso há a necessidade de se utilizar alternativas mais seguras⁵. Frente a isso, o digluconato de clorexidina a 2% tem se apresentado como solução alternativa, e entre as vantagens de utilização estão sua capacidade de ação antibacteriana, antifúngica e efeito residual⁶. Como contraponto, apresenta a impossibilidade de dissolução tecidual^{7, 8}.

O uso de formulações nanoestruturadas tem sido proposto como soluções irrigadoras, e entre elas as microemulsões^{9,10}. Estas são definidas como formulações que possuem estabilidade termodinâmica, transparência óptica, isotrópicas e de viscosidade baixa, formados por gotículas em escala nanométrica, facilidade e baixo custo de preparação, bem como a modulação da liberação dos fármacos^{11,12,13}. A utilização de formulações nanoestruturadas com a clorexidina entre seus constituintes permitiu a redução da concentração utilizada de 2% para 1,6%⁹ e a ampliação da liberação da quantidade de clorexidina ao estudar seu efeito de substantividade¹⁰.

Para complementar a ação das soluções irrigadoras utilizadas durante a instrumentação dos canais radiculares, terapias adjuvantes tem sido

sugeridas^{2,14}. Entre elas, a irrigação ultrassônica passiva se apresenta como opção¹⁵ pois ao utilizar a ativação ultrassônica, ocorre a formação de microcavitações acústicas e consequente agitação da solução irrigadora, que aumentam sua capacidade de remoção de detritos nos canais radiculares e a dissociação do biofilme bacteriano¹⁶.

Embora novas formulações e terapias complementares sejam testadas isoladamente com o intuito de aumentar os índices de sucesso da terapia pulpar, é necessário avaliar o sinergismo entre as soluções irrigadoras e terapias adjuvantes. Frente ao exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da agitação ultrassônica passiva frente a atividade antimicrobiana e substantividade de microemulsão contendo clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a formulação da microemulsão foram utilizados Tween80® P.S. (Polissorbato) e Miristrato de Isopropila® P.A. (Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba-SP, Brasil), Transcutol P® (Fagron, Anápolis-GO, Brasil), Digluconato de Clorexidina (Teor 20%) (Art Farma, Teresina-PI, Brasil), Óleo essencial de alecrim pimenta – *Lippia sidoides* (Lazlo, Belo Horizonte-MG, Brasil).

Os dentes bovinos foram gentilmente cedidos por Frigotil (Timon-MA, Brasil). Para seccioná-los foram utilizados discos diamantados (American Burs®, Palhoça-SC, Brasil), para o preparo dos condutos foram utilizadas limas reciprocantes R50 (Vdw®, Munique, Alemanha), motor endodôntico VDW Silver e contra-ângulo (Vdw®, Munique, Alemanha), e para ativação ultrassônica o inserto Irrisonic E1 (Helse®, São Paulo, Brasil) acoplado em equipamento ultrassônico Profi-Class III (Dabi-Atlante®, Ribeirão Preto, Brasil). Também foi utilizado clorexidina gel (Maquira®, São Paulo, Brasil).

Métodos

Formulação e caracterização da microemulsão

Os protocolos para a obtenção da formulação e sua caracterização seguiram método utilizado por Santana Neto *et al*, 2020¹⁰.

Obtenção da formulação nanoestruturada

Para a obtenção da formulação nanoestruturada foi utilizado um tensoativo (Tween80®) associado a um co-tensoativo (Transcutol®), em seguida incorporou-se a fase oleosa, constituída de um óleo sintético (Miristrato de isopropila®) e do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) (Lazlo, Belo Horizonte, Brasil). A fase aquosa contém água purificada, obtida através de sistema osmose reversa (Milipore, Alemanha), e clorexidina a 2% (Art farma, Teresina, Brasil). Conforme descrição da Tabela 01 proporções adequadas de tensoativo e co-tensoativo, fase oleosa e fase aquosa foram homogeneizadas sob agitação magnética com velocidade igual a 300 rpm, por dez minutos à temperatura ambiente.¹⁰

Tabela 1: Descrição da composição da microemulsão utilizada na pesquisa, função e proporção.

Componentes	Função	Proporção em peso (%)
Tween® 80	Tensoativo	43,9%
Transcutol® P	Co tensoativo	11%
Miristrato de Isopropila®	Fase Oleosa	4,1%
Óleo essencial de alecrim pimenta (<i>Lippia sidoides</i>)	Fase Oleosa	2%
Digluconato de Clorexidina	Fase Aquosa	2%
Água destilada q.s.p	Fase Aquosa	37%

Confecção de modelos de dentes bovinos

Dentes Incisivos bovinos foram extraídos, mediante autorização e doação pelo frigorífico FRIGOTIL (Timon, Brasil) em acordo com as Lei nº

11.794, de 08 de agosto de 2008, e Lei nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998, que versam sobre a utilização de material biológico proveniente de abatedouros para a realização de pesquisas científicas. Estes foram acondicionados em soro fisiológico e posteriormente limpos para que não houvesse resquícios de osso e ligamento periodontal¹⁷. Em seguida as raízes foram seccionadas transversalmente de forma que medissem 18mm do ápice até a região da secção, e o tecido pulpar removido com uso de limas reciprocantes R50 (VDW®, São Paulo, Brasil). Essas raízes então foram esterilizadas em autoclave.

Para a confecção do modelo com raízes de dentes bovinos, a superfície dentária externa foi selada com esmalte de unha incolor, e o forame apical com barreira gengival fotopolimerizável. Potes dappen foram isolados, e resina acrílica autopolimerizável incolor foi usada para preencher a região de maior embocadura. Em seguida, as raízes foram inseridas individualmente em cada pote, estando completamente envoltas pela resina acrílica. Após a presa do material, cada unidade de estudo foi destacada e estocada para uso em momento oportuno.

Para os modelos de dentina bovina a serem utilizadas no estudo de substantividade a referência passou a ser a junção amelodentinária, onde foi realizada a marcação inicial e 1 (um) centímetro abaixo desta foi delimitada a segunda marcação. Após a secção da estrutura dentária, foram obtidos blocos (semelhante a anéis) de raiz bovina medindo 1cm de espessura. A superfície externa desses blocos foi selada com esmalte de unha incolor¹⁰.

Determinação das melhores condições para ativação ultrassônica, via planejamento fatorial 2³

A análise fatorial 2³ é uma ferramenta estatística útil, onde a interação entre diversas variáveis, analisadas por modelos estatísticos, podem ser avaliadas e seus resultados utilizados para definir as melhores condições experimentais¹⁸. As definições dos parâmetros do planejamento fatorial 2³(conforme Tabela 2)partiram das instruções do fabricante do inserto ultrassônico Irrisonic E1 (Helse, São Paulo, Brasil), onde preconizam sua utilização com potência máxima de 20% e mínima de 10% , e do protocolo preconizado por Van der Sluis ¹⁹,que sugere ativação ultrassônica em três ciclos de 20 segundos de agitação, com intervalo de igual período de tempo .

Foi utilizado um aparelho gerador de onda ultrassônica Profi Class III (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil) (com frequência entre 24000 e 30000 Hz) que através de um transdutor, utilizando pastilhas cerâmicas, transmite a instrumentos ativos, vibração mecânica na mesma frequência. A refrigeração não foi utilizada devido a utilização da irrigação ultrassônica passiva.

Tabela 2: Parâmetros utilizados para realização do planejamento fatorial 2³

		Níveis usados	
		-1	+1
Fatores (variáveis independentes)			
A	Potência do ultrassom (%)	10	20
B	Tempo do ultrassom (seg.)	30	60
C	Ciclos do ultrassom	1	3
Respostas (variáveis dependentes)			
R1	Tamanho da gotícula (nm)		
R2	Índice de polidispersão		
R3	Potencial zeta (mV)		

A influência da agitação ultrassônica na formulação nanoestruturada foi avaliada em relação ao tamanho das partículas (diâmetro médio), índice de polidispersão e potencial zeta (ζ), com o objetivo de definir as condições ótimas da microemulsão para os ensaios que foram submetidas. Potência do ultrassom; tempo de agitação e ciclos de agitação foram as condições utilizadas para avaliar suas influências na microemulsão, conforme a Tabela 2.

As possíveis combinações do delineamento resultaram em oito condições experimentais (F1-F8), que estão descritas na tabela 3. Essas combinações foram utilizadas para buscar a condição otimizada que afetasse menos a morfologia da microemulsão após o processo de agitação ultrassônica no modelo de dente bovino. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 3. Descrição dos fatores, respostas e níveis usados no planejamento fatorial 2³

Combinacões	Condições		
	Potência (%)	Tempo (s)	Ciclos
F1	20	60	1
F2	10	60	3
F3	10	30	1
F4	20	30	3
F5	20	60	3
F6	10	30	3
F7	10	60	1
F8	20	30	1

Para realização do estudo, os modelos de raízes bovinas foram utilizados. O conduto radicular estava completamente preenchido pela microemulsão e após a ativação do inserto ultrassônico de acordo com cada combinação proposta, a formulação agitada foi aspirada e inserida em Ependorf de 1,5mL, diluídas em Água Milli-Q na proporção de 1:100 e lidas em Zetasizer nanoseries (Malvern, Inglaterra).

Para avaliar o melhor ajuste do modelo foi utilizado o software de experimentos (Design-Expert) (versão de teste 12.0.1.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA). Cada parâmetro foi testado estatisticamente por análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Além disso, os valores de R² ajustado e R² previsto do modelo foram determinados para cada resposta, no qual a diferença entre ambos não deve ser menor que 0,2. Os modelos de resposta foram otimizados para reduzir o diâmetro médio de gotícula, como também o índice de polidispersão e aumentar o potencial zeta(ζ). A composição com maior valor de desejabilidade (*desirability*) foi escolhida como a condição ideal para a realização dos demais ensaios.

Caracterização físico-química das formulações microemulsionadas

Características organolépticas

Na análise organoléptica do sistema foram observados: o seu aspecto, cor, homogeneidade e processos de instabilidade como cremação e separação de fases²⁰.

Doseamento da clorexidina contida na microemulsão

Para a determinação do teor de clorexidina na curva de calibração do sistema nanoestruturado, a técnica de espectrofotometria por UV foi utilizada ao realizar as leituras em Espectrofotômetro UV-Vis UV 1800 (Shimadzu, Japão). Todas as análises foram realizadas a 25°C na faixa de 265,8 nm, com cubeta de quartzo de 1cm, e o solvente utilizado etanol/água (1:1, v/v) conforme método validado por Santana Neto *et al*,2020¹⁰.

Determinação de tamanho(nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ)

O tamanho das gotículas nanométricas e índice de polidispersão foi determinado através da técnica de espalhamento de dinâmico de luz (DLS), também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS), cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das partículas coloidais (Malvern, Inglaterra). O experimento foi realizado em triplicata²⁰.

Ensaio de liberação de clorexidina veiculada em microemulsão, em condições de influência de agitação ultrassônica

O ensaio de liberação *in vitro* da microemulsão contendo clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) foi realizado utilizando células de difusão do tipo Franz em modelo automatizado Phoenix™ (Teledyne Hanson Research, FL, USA). Este sistema é composto por uma célula de vidro doadora e uma receptora separada por uma membrana de difusão de acetato de celulose (Milipore MWCO 4000-6000). A amostra foi depositada sob a membrana em contato com o meio receptor, permitindo a passagem da microemulsão da parte doadora para a receptora. A área de difusão das células foi de 1,77 cm² com 12 mL de volume do compartimento receptor.

Para realização do estudo, os modelos de raízes bovinas foram utilizados. O conduto radicular estava completamente preenchido pela microemulsão e logo após a ativação do inserto ultrassônico sob as condições otimizadas, seu conteúdo foi aspirado e uma alíquota 400 μ L da microemulsão foi depositada sob a membrana de difusão na parte doadora da célula de Franz. O meio receptor composto por tampão fosfato 50 Mm com Tween 80 a 0,5% (pH= 7,4) foi escolhido para manter a condição “sink’ do sistema. Para o ensaio foram utilizadas seis células de difusão do tipo Franz, mantidas à temperatura de 37°C sob agitação magnética a 400 rpm.

Para analisar o perfil de liberação, amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos (contados a partir do início do experimento): 1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6 horas. As leituras das alíquotas coletadas serão realizadas em UV-Vis conforme tópico presente no estudo de Santana Neto et al,2020¹⁰. O volume total da fase receptora será substituído a cada amostragem para reposição do meio²⁰.

A fim de determinar o mecanismo de liberação do fármaco das formulações, os dados experimentais foram ajustados a diferentes modelos cinéticos usando o suplemento DDSolver para Microsoft Excel®²¹. O modelo que melhor descreveu os dados de liberação foi avaliado com base no coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado), na raiz do erro quadrático médio (RMSE) e no critério de seleção do modelo (MSC). O método mais adequado será aquele com o maior R^2 ajustado, menor RMSE e maior MSC²¹.

A microemulsão sem influência da ativação ultrassônica também foi analisada seguindo a mesma metodologia em que a microemulsão agitada fora submetida.

Análise da substantividade em modelo de dentina bovina

Para avaliar a substantividade foram utilizados 16 cilindros oriundos da raiz de incisivos bovinos, com 1cm de espessura, oriundas do terço cervical, imersos por cinco minutos nas seguintes formulações: Microemulsão contendo clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) (Grupo 1), Gel comercial de clorexidina a 2% (Grupo 2). Cada grupo foi subdividido em A (com agitação) e B (sem agitação), e testados nas condições estabelecidas por meio do planejamento fatorial 2³.

Em seguida, os espécimes foram lavados em água destilada para remover o excesso das formulações, por meio de dez imersões consecutivas. Após a lavagem, foram estocados em tubos de ensaio contendo 10mL de água destilada.

Alíquotas de 3mL foram removidas de cada tubo de ensaio para avaliar a quantidade de clorexidina presente na amostra, em seguida a mesma quantidade de água destilada foi repostada, para que os blocos de dentina permanecessem submersos no mesmo volume de solução. As coletas das amostras foram realizadas nos seguintes tempos: 10 min, 30 min, 60 min, 120 min e 360 min. As alíquotas foram avaliadas por método de quantificação por espectroscopia UV/Vis ($\lambda = 265,8 \text{ nm}$).

Avaliação da atividade antimicrobiana das formulações

Obtenção da concentração inibitória mínima

A análise da atividade antimicrobiana foi realizada com a utilização de microplacas estéreis com 96 poços. Com isso, a avaliação da CMI (Concentração Mínima Inibitória) foi determinada pela metodologia da microdiluição em caldo proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) modificada, em que o caldo Muller-Hinton substituiu o caldo BHI (Brain Heart Infusion). Utilizou-se as cepas *Enterococcus faecalis* NCTC12697 (WDCM00087) e *Candida albicans* ATCC® 10231²².

Suspensões bacterianas e fúngicas de aproximadamente 1×10^5 UFC / mL foram expostas a diferentes formulações com concentração inicial de 2% diluídas em série (variando de 1:2 a 1:256). As placas de microtitulação com *Enterococcus faecalis* foram incubadas a 37 ° C por 24 h, e as contendo *Candida albicans* foram incubadas a 37 ° C por 48 h. Em seguida, 30 μ L de resazurina (0,01% p/v em água destilada estéril) foram adicionados a cada poço para detectar crescimento bacteriano por mudança de cor de azul para rosa. CMI foi definido como a concentração mais baixa em que nenhum crescimento bacteriano e/ou fúngico foi observado. Os experimentos foram realizados em triplicata ²².

Para a realização do teste os grupos foram divididos em: Microemulsão contendo clorexidina e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) (Grupo 1), Gel de clorexidina a 2% (Maquira, São Paulo, Brasil) (Grupo

PÁGINAS SUPRIMIDAS

30 - 44

Conclusões:

Após os resultados obtidos por este estudo, podemos inferir que a microemulsão permanece com as melhores características no sistema de canais radiculares mesmo após a aplicação do protocolo de irrigação, e não existe indício de mudança na estrutura da formulação após a aplicação destas condições experimentais: ativação do inserto ultrassônico em potência de 20%, durante três ciclos de 10 segundos. A ativação ultrassônica aumentou a substantividade em modelo de dentina bovina.

Além disso observou-se que a microemulsão possui atividade antifúngica superior a formulação comercial de clorexidina, como também demonstrou ser um veículo promissor para carrear a clorexidina, onde a presença do óleo essencial de alecrim pimenta poderá ampliar a atividade antifúngica das soluções irrigadoras.

Visto os resultados encontrados a microemulsão tem potencial promissor enquanto solução irrigadora dos canais radiculares. O aprofundamento dos estudos sobre efeito sinérgico da clorexidina com o óleo essencial de alecrim pimenta, citotoxicidade, e ensaios de sobre segurança de sua aplicabilidade clínica poderão corroborar com as expectativas geradas por esta pesquisa.

Referências bibliográficas

1. Haberthür D, Hlushchuk R, Wolf TG. Automated segmentation and description of the internal morphology of human permanent teeth by means of micro-CT. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):1–9. doi:10.1186/s12903-021-01551-x
2. Orozco EIF, Toia CC, Cavalli D, et al. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: A randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci*. 2020;28(November). doi:10.1590/1678-7757-2019-0100
3. Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod*. 2017;43(8):1237–1245. doi:10.1016/j.joen.2017.03.032
4. Vatkar NA, Hegde V, Sathe S. Vitality of *Enterococcus faecalis* inside dentinal tubules after five root canal disinfection methods. *J Conserv Dent*. 2016;19(5):445–449. doi:10.4103/0972-0707.190019
5. Demenech LS, Tomazinho FSF, Baratto-Filho F, Brancher JA, Pereira LF, Gabardo MCL. Biocompatibility of the 8.25% sodium hypochlorite irrigant solution in endodontics: An in vivo study. *Microsc Res Tech*. 2021;84(7):1506–1512. doi:10.1002/jemt.23706
6. Gonçalves LS, Rodrigues RCV, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: A systematic review of clinical trials. *J Endod*. 2016;42(4):527–532. doi:10.1016/j.joen.2015.12.021
7. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Endod*. Published online 2020. doi:10.1016/j.joen.2020.05.002
8. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004;37(1):38–41. doi:10.1111/j.1365-2591.2004.00749.x
9. Abdelmonem R, Younis MK, Hassan DH, et al. Formulation and characterization of chlorhexidine HCL nanoemulsion as a promising antibacterial root canal irrigant: In-vitro and ex-vivo studies. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:4697–4708. doi:10.2147/IJN.S204550
10. Santana Neto MC, Costa MLV de A, Fialho PH da S, et al. Development of Chlorhexidine Digluconate and Lippia sidoides Essential Oil Loaded in Microemulsion for Disinfection of Dental Root Canals: Substantivity Profile and Antimicrobial Activity. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21(8). doi:10.1208/s12249-020-01842-6
11. Da Silva JDF, Da Silva YP, Piatnicki CMS, Böckel WJ, Mendonça CRB.

- Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Quim Nova*. 2015;38(9):1196–1206. doi:10.5935/0100-4042.20150135
12. Mistraletti G, Paroni R, Umbrello M, et al. Different routes and formulations of melatonin in critically ill patients. A pharmacokinetic randomized study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;91(1):209–218. doi:10.1111/cen.13993
 13. Oliveira AG de, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim Nova*. 2004;27(1):131–138. doi:10.1590/s0100-40422004000100023
 14. Sasanakul P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod*. 2019;45(3):332–337. doi:10.1016/j.joen.2018.11.015
 15. Vivian RR, Duque JA, Alcalde MP, Só MVR, Bramante CM, Duarte MAH. Evaluation of different passive ultrasonic irrigation protocols on the removal of dentinal debris from artificial grooves. *Braz Dent J*. 2016;27(5):568–572. doi:10.1590/0103-6440201600725
 16. Bueno CRE, Cury MTS, Vasques AMV, et al. Cleaning effectiveness of a nickel-titanium ultrasonic tip in ultrasonically activated irrigation: A SEM study. *Braz Oral Res*. 2019;33:1–9. doi:10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0017
 17. Justo AM, Da Rosa RA, Santini MF, et al. Effectiveness of final irrigant protocols for debris removal from simulated canal irregularities. *J Endod*. 2014;40(12):2009–2014. doi:10.1016/j.joen.2014.08.006
 18. Kramer DG, Cavalcanti Junior GB, Sousa AM de, Costa JB. Análise fatorial da adsorção de cobre em solução aquosa por hidroxiapatita. *Eng Sanit e Ambient*. 2021;26(5):877–881. doi:10.1590/s1413-415220190054
 19. van der Sluis LWM, Vogels MPJM, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant. *J Endod*. 2010;36(4):737–740. doi:10.1016/j.joen.2009.12.004
 20. Figueiredo KA, Neves JKO, da Silva JA, de Freitas RM, Carvalho ALM. Phenobarbital loaded microemulsion: Development, kinetic release and quality control. *Brazilian J Pharm Sci*. 2016;52(2):251–264. doi:10.1590/S1984-82502016000200003
 21. Zhang Y, Huo M, Zhou J, et al. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J*. 2010;12(3):263–271. doi:10.1208/s12248-010-9185-1
 22. Rezende-Júnior LM, Andrade LM de S, Leal ALAB, et al. Chalcones isolated from Arrabidaea brachypoda flowers as inhibitors of nora and mepa multidrug efflux pumps of Staphylococcus aureus. *Antibiotics*. 2020;9(6):1–12. doi:10.3390/antibiotics9060351

23. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2720–2722. doi:10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002
24. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res*. 2009;26(5):1025–1058. doi:10.1007/s11095-008-9800-3
25. Marion JJ de C, Pavan K, Arruda MEBF, Nakashima L, de Morais CAH. Chlorhexidine and its applications in Endodontics: A literature review. *Dent Press Endod*. 2013;3(3):36–54.
26. Aspectos V. PLANEJAMENTO FATORIAL : UMA FERRAMENTA ESTATÍSTICA VALIOSA PARA A DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA PESQUISA CIENTÍFICA . FACTORIAL DESIGN : A VALUABLE STATISTIC TOOL TO DEFINE EXPERIMENTAL PARAMETERS APPLIED IN SCIENTIFIC RESEARCH Para . Published online 2008:23–32.
27. Samiun WS, Ashari SE, Salim N, Ahmad S. Optimization of processing parameters of nanoemulsion containing aripiprazole using response surface methodology. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:1585–1594. doi:10.2147/IJN.S198914
28. Boutsoukis C, Verhaagen B, Walmsley AD, Versluis M, Van Der Sluis LWM. Measurement and visualization of file-to-wall contact during ultrasonically activated irrigation in simulated canals. *Int Endod J*. 2013;46(11):1046–1055. doi:10.1111/iej.12097
29. Joy J, Mathias J, Sagir VMM, Babu BP, Chirayath KJ, Hameed H. Bacterial Biofilm Removal Using Static and Passive Ultrasonic Irrigation. *J Int oral Heal JIOH*. 2015;7(7):42–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26229369>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4513774>
30. Pongsumpun P, Iwamoto S, Siripatrawan U. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. *Ultrason Sonochem*. 2020;60(April 2019):104604. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.05.021
31. Ngan CL oon., Basri M, Lye FF an., et al. Comparison of process parameter optimization using different designs in nanoemulsion-based formulation for transdermal delivery of fullerene. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4375–4386. doi:10.2147/IJN.S65689
32. Stetefeld J, Mckenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering : a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016;(June 2020). doi:10.1007/s12551-016-0218-6
33. Vadhana S, Latha J, Velmurugan N. Evaluation of penetration depth of 2% chlorhexidine digluconate into root dentinal tubules using confocal laser scanning microscope. *Restor Dent Endod*. 2015;40(2):149.

doi:10.5395/rde.2015.40.2.149

34. Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm.* 2007;57(3):315–332. doi:10.2478/v10007-007-0025-5
35. Gurpreet K, Singh SK. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian J Pharm Sci.* 2018;80(5):781–789.
36. Zetasizer Nano Series User Manual Zetasizer Nano Series User Manual M A N 0 3 1 7 I s s u e 2. 1 J u l y 2 0 0 4. 2004;(2).
37. Taheri A, Razavi SMA. Fabrication of Cress Seed Gum Nanoparticles, an Anionic Polysaccharide, Using Desolvation Technique: an Optimization Study. *Bionanoscience.* 2015;5(2):104–116. doi:10.1007/s12668-015-0169-6
38. Remington JP. The united states pharmacopeia of 1900. *J Am Med Assoc.* 1901;XXXVI(11):729–731. doi:10.1001/jama.1901.52470110031002h
39. Fiorentino FAM, Corrêa MA, Salgado HRN. Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution. *Brazilian J Pharm Sci.* 2013;49(2):351–358. doi:10.1590/S1984-82502013000200017
40. Resende KX, Corrêa MA, De Oliveira AG, Scarpa MV. Effect of cosurfactant on the supramolecular structure and physicochemical properties of non-ionic biocompatible microemulsions. *Rev Bras Ciências Farm J Pharm Sci.* 2008;44(1):35–42. doi:10.1590/S1516-93322008000100005
41. Valente BR. Estudo comparativo dos perfis de dissolução de cápsulas de cloridrato de fluoxetina. *Rev Eletrônica Farmácia.* 2013;10(3):1–10. doi:10.5216/ref.v10i3.26644
42. Alireza Mortazavi S, Pishrochi S, Jafari Azar Z. Formulation and in-vitro evaluation of tretinoin microemulsion as a potential carrier for dermal drug delivery. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(4):599–609.
43. Kajbafvala A, Salabat A, Salimi A. *Formulation, characterization, and in vitro/ex vivo evaluation of quercetin-loaded microemulsion for topical application.* Vol 23. Taylor & Francis; 2018. doi:10.1080/10837450.2016.1263995
44. Ramalho ÍM de M, Bezerra GS, Ostrosky EA, et al. Chrysin-Loaded Microemulsion: Formulation Design, Evaluation and Antihyperalgesic Activity in Mice. *Appl Sci.* 2022;12(1). doi:10.3390/app12010477
45. Khademi A ali, Mohammadi Dr Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J.* 2006;32(3):112–115. doi:10.1111/j.1747-4477.2006.00033.x
46. Souza MA, Menon CZ, Nery LF, Bertol CD, Rossato-Grando LG, Cecchin D. Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine

- substantivity on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):859–865. doi:10.1007/s00784-017-2162-7
47. Bantle M de LD, Rosas CAP, Limoeiro AG da S, et al. Eficácia da irrigação ultrassônica passiva no tratamento endodôntico. *Res Soc Dev*. 2021;10(14):e106101421879. doi:10.33448/rsd-v10i14.21879
 48. Moreira RN, Pinto EB, Galo R, Falci SGM, Mesquita AT. Passive ultrasonic irrigation in root canal: systematic review and meta-analysis. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(1):55–60. doi:10.1080/00016357.2018.1499960
 49. Pelegrini FC. Influência Da Ativação Ultrassônica Do Gel De Hipoclorito De Sódio 3 %, E Da Medicação Intracanal Com Hidróxido De Cálcio Sobre Micro-. Published online 2017.
 50. Neelakantan P, Romero M, Vera J, et al. Biofilms in Endodontics— Current status and future directions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8). doi:10.3390/ijms18081748
 51. De-Deus G, Simões-Carvalho M, Belladonna FG, et al. Arrowhead design ultrasonic tip as a supplementary tool for canal debridement. *Int Endod J*. 2020;53(3):410–420. doi:10.1111/iej.13236
 52. Calixto GMF, Duque C, Aida KL, dos Santos VR, Massunari L, Chorilli M. Development and characterization of p1025-loaded bioadhesive liquid-crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Nanomedicine*. 2017;13:31–41. doi:10.2147/IJN.S147553
 53. Telles ISF, Prado M Do, Simão RA. Nanopartículas e aplicações endodônticas: uma revisão da literatura. *Rev Bras Odontol*. 2017;74(2):167. doi:10.18363/rbo.v74n2.p.167
 54. Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. *Open Dent J*. 2016;10(1):692–703. doi:10.2174/1874210601610010692
 55. Botelho MA, Barros G, Queiroz DB, et al. Nanotechnology in Phytotherapy: Antiinflammatory Effect of a Nanostructured Thymol Gel from *Lippia sidoides* in Acute Periodontitis in Rats. *Phyther Res*. 2016;30(1):152–159. doi:10.1002/ptr.5516
 56. Fukushima RS, Weimer PJ, Kunz DA. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic clostridium species. *Brazilian J Microbiol*. 2003;34(1):22–26. doi:10.1590/S1517-83822003000100006
 57. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
 58. Reddy NBN, Sridhar D, Rajkumar A, Murugesan S, Selvaraj K, Sankar S. Comparative Evaluation of Antifungal Activity of Octenidine: An In Vitro

- Confocal Laser Study. *J Contemp Dent Pract.* 2020;21(8):905–909. doi:10.5005/JP-JOURNALS-10024-2860
59. Awawdeh L, Jamleh A, Al Beitawi M. The antifungal effect of propolis endodontic irrigant with three other irrigation solutions in presence and absence of smear layer: An in vitro study. *Iran Endod J.* 2018;13(2):234–239. doi:10.22037/iej.v13i2.19227
60. Abraham SB, al Marzooq F, Himratul-Aznita WH, Ahmed HMA, Samaranayake LP. Prevalence, virulence and antifungal activity of *C. albicans* isolated from infected root canals. *BMC Oral Health.* 2020;20(1):1–10. doi:10.1186/s12903-020-01347-5
61. Chua EG, Parolia A, Ahlawat P, Pau A, Amalraj FD. Antifungal effectiveness of various intracanal medicaments against *Candida albicans*: An ex-vivo study. *BMC Oral Health.* 2014;14(1). doi:10.1186/1472-6831-14-53
62. GOUVEIA CL, FREIRE ICM, LEITE ML de A e S, et al. Antifungal activity of components used for decontamination of dental prostheses on the growth of *Candida albicans* Atividade antifúngica de produtos utilizados na descontaminação de próteses dentárias sobre o crescimento de. *Rev Odontol UNESP.* 2014;43(2):137–143. <http://dx.doi.org/10.1590/rou.2014.018>
63. Kloster AP, Neto NL, da Costa SA, Oliveira TM, de Oliveira RC, Machado MAAM. In vitro antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorhexidine gel. *Braz Dent J.* 2018;29(4):354–358. doi:10.1590/0103-6440201801743
64. Srinivasan S, Velusamy G, Munshi MAI, Radhakrishnan K, Tiwari RVC. Comparative Study of Antifungal Efficacy of Various Endodontic Irrigants with and without Clotrimazole in Extracted Teeth Inoculated with *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract.* 2020;21(12):1325–1330. doi:10.5005/jp-journals-10024-2939
65. Kameri A, Koçani F, Hashani Z, et al. Antifungal and Synergistic Effects of the Ethyl Acetate Extract of *Tanacetum vulgare* (L.) Against *Candida albicans*. *Med Sci Monit Basic Res.* 2019;25:179–186. doi:10.12659/MSMBR.917394
66. Maekawa LE, Oliveira LD De, Qwrqlr O, Elrldfwlyh RI, Fkhplfdo L, Ru P. Microorganisms and Endotoxins in Root Canals. *J Apol Oral Sci.* 2013;21(C1x):25–31.
67. Martínez A, Manrique-Moreno M, Klais-Luna MC, Stashenko E, Zafra G, Ortiz C. Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics.* 2021;10(12). doi:10.3390/antibiotics10121474
68. de Brito Costa EMM, de Araújo Evangelista AP, de Medeiros ACD, Dametto FR, de Carvalho RA. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. *Braz Oral Res.* 2012;26(3):215–221. doi:10.1590/S1806-83242012000300006

69. Lobo PLD, Fonteles CSR, Marques LARV, et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine*. 2014;21(8–9):1043–1047. doi:10.1016/j.phymed.2014.04.021
70. Pinto CDP, Rodrigues VD, Pinto FDP, et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/614501
71. Almeida MC, Pina ES, Hernandez C, et al. Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). *BMC Res Notes*. 2018;11(1):1–14. doi:10.1186/s13104-018-3839-y
72. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian J Med Biol Res*. 2007;40(3):349–356. doi:10.1590/S0100-879X2007000300010
73. Cáceres M, Hidalgo W, Stashenko E, Torres R, Ortiz C. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*. 2020;9(4). doi:10.3390/antibiotics9040147
74. Escobar A, Pérez M, Romanelli G, Blustein G. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arab J Chem*. 2020;13(12):9243–9269. doi:10.1016/j.arabjc.2020.11.009
75. Nagendrababu V, Jayaraman J, Suresh A, Kalyanasundaram S, Neelakantan P. Effectiveness of ultrasonically activated irrigation on root canal disinfection: a systematic review of in vitro studies. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):655–670. doi:10.1007/s00784-018-2345-x
76. Căpută PE, Retsas A, Kuijk L, Chávez de Paz LE, Boutsoukis C. Ultrasonic Irrigant Activation during Root Canal Treatment: A Systematic Review. *J Endod*. 2019;45(1):31-44.e13. doi:10.1016/j.joen.2018.09.010
77. Susila A, Minu J. Activated irrigation vs. Conventional non-activated irrigation in endodontics – A systematic review. *Eur Endod J*. 2019;4(3):96–110. doi:10.14744/eej.2019.80774
78. Carver K, Nusstein J, Reader A, Beck M. In Vivo Antibacterial Efficacy of Ultrasound after Hand and Rotary Instrumentation in Human Mandibular Molars. *J Endod*. 2007;33(9):1038–1043. doi:10.1016/j.joen.2006.11.026
79. de Vasconcelos LRSM, Midea RZ, Minotti PG, Pereira TC, Duarte MAH, De Andrade FB. Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. *J Appl Oral Sci*. 2017;25(5):477–482. doi:10.1590/1678-7757-2016-0358

APÊNDICE A – Tabelas Suplementares

Tabela 1: Resumo da análise de regressão das respostas

Modelo	R ²	R ² Ajustado	R ² Previsto	Precisão Adequada	Desvio Padrão	CV (%)
Tamanho	0,94	0,92	0,87	14,00	0,03	19,55
IPd	0,48	0,25	-0,17	4,00	0,06	13,57
Potencial Zeta	0,69	0,56	0,31	6,89	5,03	31,13

Equações de regressão do modelo ajustado

R1 = 0,1647 - 0,0207A - 0,0216B + 0,0261C - 0,0233AB + 0,0201AC + 0,0358BC - 0,0859ABC

R2 = 0,4628 - 0,0136A - 0,0033B - 0,0192C + 0,0226AB + 0,0080AC - 0,0111BC + 0,0341ABC

R3 = 16,15 - 2,17A + 0,1700B - 0,1350C - 0,4400AB + 2,36AC - 1,46BC + 5,03ABC

Tabela 2: Resumo da Anova para tamanho da gotícula

Parâmetros	Soma dos quadrados	df	Média	Valor de F	Valor de p
Modelo	0,24	7	0,03	36,58	< 0.0001
A-Potência	0,0097	1	0,0097	10,16	0,0061
B-Tempo	0,0105	1	0,0105	10,96	0,0047
C-Ciclos	0,0154	1	0,0154	16,07	0,0011
AB	0,0123	1	0,0123	12,83	0,0027
AC	0,0091	1	0,0091	9,55	0,0075
BC	0,0290	1	0,0290	30,33	< 0.0001
ABC	0,1667	1	0,1667	174,24	< 0.0001
Pure Error	0,0144	15	0,0010		
Cor Total	0,2594	22			

Tabela 3: Resumo da Anova para índice de polidispersão

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	0,0583	7	0,0083	2,11	0,1021
A-Potência	0,0045	1	0,0045	1,13	0,3036
B-Tempo	0,0003	1	0,0003	0,0659	0,8006
C-Ciclos	0,0089	1	0,0089	2,25	0,1535
AB	0,0123	1	0,0123	3,12	0,0966
AC	0,0016	1	0,0016	0,3935	0,5393
BC	0,0030	1	0,0030	0,7532	0,3983
ABC	0,0279	1	0,0279	7,09	0,0170
Pure Error	0,0631	16	0,0039		
Cor Total	0,1214	23			

Tabela 4: Resumo da Anova para Potencial ζ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	Valor de F	Valor de p
Model	909,76	7	129,97	5,14	0,0032
A-Potência	112,49	1	112,49	4,45	0,0509
B-Tempo	0,6936	1	0,6936	0,0275	0,8705
C-Ciclos	0,4374	1	0,4374	0,0173	0,8970
AB	4,65	1	4,65	0,1839	0,6737
AC	133,10	1	133,10	5,27	0,0356
BC	51,16	1	51,16	2,03	0,1739
ABC	607,22	1	607,22	24,04	0,0002
Pure Error	404,18	16	25,26		
Cor Total	1313,94	23			