



Universidade Estadual de Londrina

THABATA FREDERICO IZELLI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CIMENTO DE ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL MODIFICADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

Londrina
2015

THABATA FREDERICO IZELLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CIMENTO DE
ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL MODIFICADO COM ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Odontologia da Universidade Estadual de
Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto
de Almeida

Londrina
2015

THABATA FREDERICO IZELLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CIMENTO DE
ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL MODIFICADO COM ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Odontologia da Universidade Estadual de
Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Murilo Baena Lopes
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de outubro de 2015

A Deus, por ser extremamente paciente e piedoso comigo...
Aos meus pais que foram companheiros em todas as horas...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida, por toda amizade, paciência e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

A minha família, pela confiança e motivação, permitindo a realização e conclusão desta graduação.

Ao meu namorado Eduardo, pela motivação e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos amigos, pela força e pela vibração em relação a esta jornada.

Aos professores e amigos de Curso, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros”
(Wim Wenders).

IZELLI, Thabata Frederico. **Avaliação da atividade antimicrobiana do cimento de óxido de zinco e eugenol modificado com óleo essencial de orégano**. 2015. 24 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

RESUMO

Cimentos a base de óxido de zinco e eugenol são amplamente utilizados na odontologia por sua atividade antimicrobiana, fácil manipulação e acesso, porém, tem um alto teor citotóxico e genotóxico se não manipulado de maneira correta. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades antimicrobianas do cimento de óxido de zinco, substituindo o eugenol pelo óleo de orégano na mistura utilizada clinicamente. Deste modo, a concentração inibitória mínima (CIM) de cada óleo foi determinada para os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Para a determinação da atividade antimicrobiana dos cimentos, utilizou-se o método de difusão em ágar com os mesmos microrganismos citados acima. A mesma formulação de óxido de zinco foi misturada com eugenol (OZE) ou com óleo essencial de orégano (OZO), ambos nas concentrações de 10%, 25%, 50% e 75% (diluídos com óleo de amêndoas). Nossos resultados demonstraram que o CIM do eugenol foi de 0,31% para *E. coli*, 0,62% para *E. faecalis* e 0,16% para *C. albicans*, enquanto que o CIM do óleo de orégano foi de 0,16% para *E. coli*, 0,62% para *E. faecalis* e 0,08% para *C. albicans*. Em relação aos cimentos, OZE apresentou maior atividade antimicrobiana contra *E. coli*, porém o OZO foi mais eficiente contra *C. albicans* e igual para *E. faecalis*. Portanto, concluiu-se que o óleo de orégano possui ótima atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados e que o OZO apresenta uma potencial utilização na prática clínica.

Palavras-chave: Oxido de zinco e eugenol; cimento endodôntico; óleo essencial de orégano.

IZELLI, Thabata Frederick. **Antimicrobial activity assessment of zinc oxide eugenol cement and modified with essential oil of oregano**. 2015. 24 fls. Work Completion of course (Diploma in Dentistry) - State University of Londrina, Londrina. 2015.

ABSTRACT

Zinc oxide and eugenol based cements are widely used in dentistry for their antimicrobial activity, easy handling and access. However, they possess high cytotoxicity and genotoxicity if not properly handled. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial properties of the zinc oxide cement, replacing eugenol by essential oil of oregano in the mixture used clinically. Used mixture therefore, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each oil was determined for *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. To determine the antimicrobial activity of cements, was used the method of diffusion in agar with the same microorganisms listed above. The same amount of zinc oxide was mixed with eugenol (OZE) or essential oil of oregano (OZO), both at concentrations of 10%, 25%, 50% and 75% (diluted with almond oil). Our results demonstrated that the MIC of eugenol was 0.31% for *E. coli*, *E. faecalis* 0.62% and 0.16% for *C. albicans*, while the MIC for oregano oil was 0.16% for *E. coli*, 0.62% for *E. faecalis* and 0.08% for *C. albicans*. Regarding the cements, OZE showed higher antimicrobial activity against *E. coli*, whilst OZO was more effective against *E. faecalis* and *C. albicans*. So, it can be concluded that oregano oil has excellent antimicrobial activity against the microorganisms tested and OZO has a potential use in clinical practice.

Keywords: Zinc oxide and eugenol; endodontic cement; essential oil of oregano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima dos Óleos.....	17
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividade Antimicrobiana dos Cimentos	18
---	-----------

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

OZE - Cimento de óxido de Zinco e Eugenol

OZO - Cimento de óxido de Zinco e óleo essencial de Orégano

E.coli - *Escherichia coli*

E.faecalis - *Enterococcus faecalis*

C. albicans – *Candida albicans*

p/v – peso/volume

BHI – Infuso de cérebro e corao

YPD – meio de cultura

BHT – Butil-hidroxi-tolueno

PBS - salina tamponada com fosfato

Rpm- Rotao por minuto

CIM – Concentrao Inibitória Mínima

RPMI – meio de cultura

DMSO – Dimetilsulfóxido

UFC – Unidade formadora de colnia

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
3	DESENVOLVIMENTO	15
3.1	MATERIAIS E MÉTODO	15
3.1.1	Microorganismos e cultivos	15
3.1.2	Materiais dentológicos	15
3.1.3	Teste da Atividade Antimicrobiana por Difusão em Agar	15
3.1.4	Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	16
3.1.5	Análise Estatística	16
4	RESULTADOS	17
4.1	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DOS ÓLEOS	17
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CIMENTOS.....	17
5	DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	21
	REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

Todas as fases do tratamento endodôntico possuem grande importância para seu sucesso, a incorreta realização de qualquer uma das fases levaria ao insucesso do tratamento (MCELROY, 1955). Apesar disso vem se atribuindo uma maior ênfase à obturação, visto que o êxito total do tratamento vem interligado à este passo, pois todas as etapas estão interligadas e para o sucesso e longevidade do tratamento endodôntico a obturação deve ser realizada da melhor maneira possível. A obturação dos condutos radiculares consiste no preenchimento de toda sua extensão com um material inerte ou antisséptico, promovendo o selamento hermético de toda sua extensão. O preenchimento dos canais radiculares é realizado através de cones de guta-percha e cimentos endodônticos (INGLE, 1956).

Um dos primeiros cimentos utilizados no tratamento de canal, foi à base de óxido de zinco e eugenol, foi criado por Grossman em 1936. Originalmente este cimento possuía prata precipitada e óxido de magnésio, o que trazia inconvenientes, particularmente a formação de sulfato de prata, que manchava a estrutura dental. Em 1958 esse autor substituiu esses elementos por subcarbonato de bismuto e sulfato de bário, surgindo então o “New Grossman sealer”, posteriormente modificado, sendo o líquido apenas eugenol. Em 1965 começou a ser comercializado no Brasil e, desde então vem sendo popular o uso deste cimento pelos cirurgiões dentistas (ESTRELA, 2004).

O óleo de cravo é uma substância fenólica obtida da destilação das folhas, caule e flores do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que apresenta na composição de 70 a 95% do seu princípio ativo, o eugenol (MAZZAFERA, 2003). O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e ou, no material genético celular. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionado com a sua natureza fenólica. Ao ser manipulado com o pó, cerca de 5% de eugenol permanece livre causando assim uma citotoxicidade aos tecidos periapicais (MARKOWITZ et al., 1992; THOMPSON; CONSTANTIN-TEODOSIU; MOLDEUS, 1991).

Pensando em uma alternativa, o óleo essencial de orégano pode ter potencial para ser um substituto ao eugenol. Óleos essenciais como os de orégano são

utilizados na indústria como agentes antibacterianos contra microrganismos patogênicos que se proliferam em alimentos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp. (MITH et al., 2014; OUSSALAH et al., 2007). Seus efeitos antibacterianos provavelmente se devem a dois componentes principais o carvacol e o timol (BAKKALI et al., 2008). Muitos óleos essenciais têm atividade citotóxica contra células de mamíferos, porém alguns trabalhos apontam que o óleo essencial de orégano, possivelmente, não apresenta atividade citotóxica contra células de mamíferos (BAKKALI et al., 2008; HOLLENBACH et al., 2014), abrindo assim uma janela para a substituição do eugenol pelo óleo essencial de orégano.

São poucas as tentativas de trocar o eugenol por algum composto que não irrite os tecidos periapicais e adjacentes. Uma das primeiras tentativas foi realizada por Damião em 1994, adicionando ao eugenol alguns óleos vegetais como o de soja, milho e amêndoas, para melhorar suas propriedades físico-químicas. Porém os resultados demonstraram que essas adições pioraram suas propriedades e os tornaram inutilizáveis na prática clínica. Já Stankiewicz em 2000 substituiu o eugenol por isoeugenol, um composto sem atividade genotóxica e notaram um aumento de 10% no tempo de presa do cimento, podendo talvez em um futuro ser ele o substituto do eugenol. Entretanto, mais estudos são necessários (JOHNSON; GUTMANN, 2007).

Bactérias Gram positivas, Gram negativas, aeróbias facultativas ou anaeróbias estritas promovem a infecção do sistema de canais radiculares com a atividade múltipla destes microrganismos (SUNDE et al, 2002). Também podem ser encontrados fungos e vírus como agentes causadores de infecções dos condutos radiculares (BAMMANN; ESTRELA, 2004). Nesse sentido, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* são os microrganismos mais frequentes nas alterações endodônticas, principalmente no que se refere às infecções secundárias e ao aparecimento de lesões perirradiculares (SUNDE et al., 2002). Visto isso, como proposta deste trabalho testou-se a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos OZE comparado à OZO.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano, comparando com o eugenol, frente a *Enterococcus faecalis* (bactéria Gram positiva), *E. coli* (bactéria Gram negativa) e *Candida albicans* (fungo); e (ii) avaliara atividade antimicrobiana, contra esses microorganismos, de diferentes formulações do cimento de óxido de zinco com óleo essencial de orégano, comparando com o cimento comercial contendo eugenol.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 MATERIAIS E MÉTODO

3.1.1 Microorganismos e Cultivos

As análises microbiológicas dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal (NIP9) do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) –Londrina –Paraná. Para a avaliação *in vitro* do efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia (eugenol), foram utilizadas as cepas de *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212 e *C. albicans* SC 5314. As cepas de bactérias foram mantidas em placas de infusão de cérebro e coração (BHI ágar) e o fungo em YPD ágar até realização das culturas para os ensaios. Assim, as bactérias foram cultivadas por 12 horas em BHI líquido a 37°C com agitação de 150 rpm, e o fungo por 16 horas em YPD caldo a 30°C a 180rpm. Após esse período, suspensões de cada microorganismo foram ajustadas em salina tamponada com fosfato (PBS), com a escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias(UFC).

3.1.2 Materiais Odontológicos

Os óleos essenciais de orégano e cravo foram adquiridos já extraídos e industrializados. Formulações com concentrações a 10%, 20%, 25%, 50% e 75% foram diluídas em óleo de amêndoas doce puro (Galena Química e Farmacêutica Ltda., lote de fabricação ADC 146/1019) com 0,125% (p/v) da concentração final de Butil-hidroxi-tolueno (BHT-antioxidante para evitar alterações na aparência). Os óleos foram incorporados ao óxido de zinco (pó) por meio de espatulação em superfície de vidro seguindo as indicações do fabricante.

3.1.3 Teste da Atividade Antimicrobiana por Difusão em Agar

Em cada placa foi colocado 20 ml de meio correspondente ao microorganismo, BHI ágar e YPD ágar, com 2 ml da suspensão de microorganismos

homogeneizados. Os poços foram confeccionados com uma ponteira amarela, 4 por placas previamente estabelecido. Para cada microorganismo utilizaram duas placas, uma com o óleo de orégano (OZO) e outra com óleo de cravo (OZE), contendo amostras de 10%, 25%, 50% e 75% dos óleos essenciais espatulados com óxido de zinco. Os ensaios foram realizados três vezes em duplicatas. Após 24 horas de incubação das placas a 37°C, o halo de inibição decrescimento e o diâmetro do material foram medidos com um paquímetro. A zona de inibição foi calculada pela razão entre os diâmetros do halo de inibição e do material.

3.1.4 Teste para Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada óleo foi determinada para os microorganismos *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, com o método de microdiluição em microtubos. Em cada placa continha a análise de um óleo por microorganismo, em duplicata com três repetições. Os microtubos ficaram distribuídos na placa em seis fileiras com 12 microtubos, cada fileira representava um ensaio. Em todos os poços foram depositados RPMI com 1% de DMSO. No primeiro poço foi adicionado o óleo concentrado e nos poços seguintes foram realizadas diluições seriadas (1:2) por 10 vezes seguidas. Por fim, foram adicionados os microorganismos numa concentração de 10⁶ UFC por amostra. Um poço sem óleo foi utilizado como controle positivo e um poço sem óleo e sem microorganismo utilizado como controle negativo. As leituras da concentração inibitória mínima foram realizadas após 24 horas (para as bactérias) e 48 horas (para o fungo) de incubação a 37°C.

3.1.5 Análise Estatística

Para verificar se os erros seguiram uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade de variância dos erros foi verificada pelo teste de Bartlett (BARBIN, 2013). Para o teste de 7 comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Tukey, no qual verificou-se a diferença mínima significativa entre os tratamentos, considerando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (<http://www.Rproject.org>).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DOS ÓLEOS

Nossos resultados demonstraram que o CIM do eugenol foi de 0,31% para *E. coli*, 0,62% para *E. faecalis* e 0,16% para *C. albicans*, enquanto que o CIM do óleo de orégano foi de 0,16% para *E. coli*, 0,62% para *E. faecalis* e 0,08% para *C. albicans* (Tabela 1). Assim, pudemos concluir que ambos os óleos são efetivos contra os microorganismos testados.

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima dos Óleos

Microorganismo	CIM dos Óleos (% v/v)	
	Eugenol	Orégano
<i>E. coli</i> (bactéria Gram negativa)	0,31	0,16
<i>E. faecalis</i> (bactéria Gram positiva)	0,62	0,62
<i>C. albicans</i> (fungo)	0,16	0,08

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada óleo foi determinada para os microorganismos acima, com o método de microdiluição em microtubos, partindo de uma concentração de 5%.

Fonte: O próprio autor

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CIMENTOS

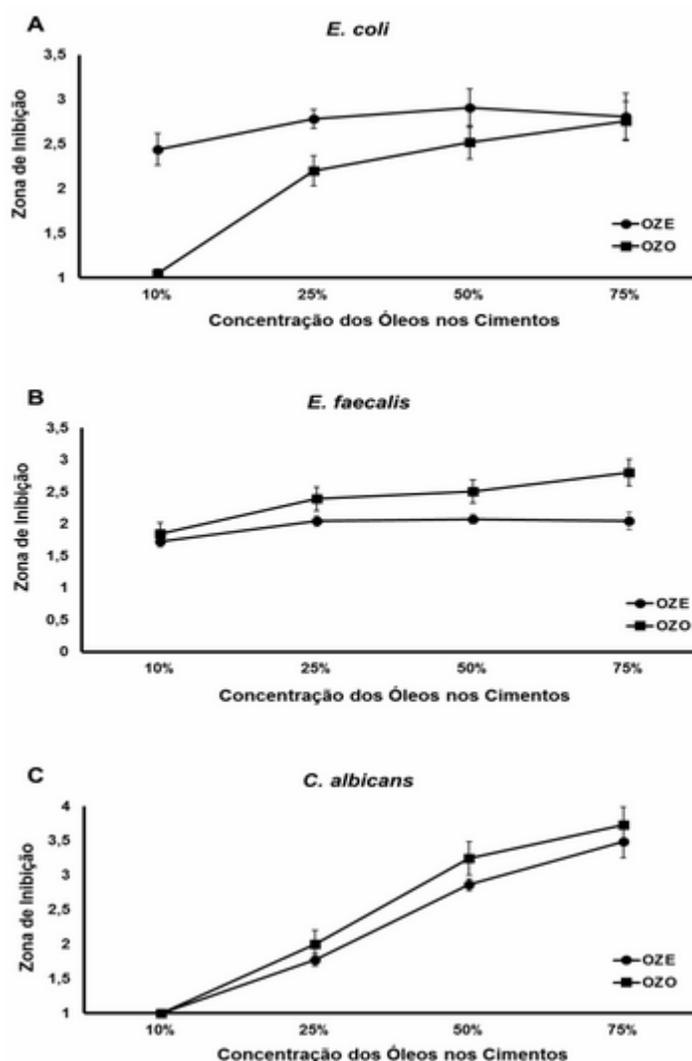
Como ambos os óleos foram efetivos de forma semelhante contra os microorganismos testados, eles foram misturados em diferentes concentrações ao óxido de zinco e a atividade antimicrobiana dos respectivos cimentos foi avaliada. Para *E. coli* (Figura 1 A), pelo teste de Tukey, para o cimento OZE, a concentração de 10% diferiu das demais, e as concentrações 75%, 50% e 25% não apresentaram diferença significativa. Já para o cimento OZO, a concentração 75% não diferiu de 50%, mas foi diferente das demais; a concentração 50% diferiu apenas de 10%; e a concentração 25% diferiu de 75% e 10%. A comparação entre os cimentos OZE e OZO demonstrou que há diferença significativa nas concentrações de 10%, 25% e

50%, enquanto que para a concentração de 75% não houve diferença significativa (Figura 1 A).

Em relação a *E. faecalis*, o cimento com 10% de eugenol (OZE) foi diferente dos demais. Para os cimentos contendo óleo de orégano (OZO), a concentração de 75% diferiu das demais; as concentrações de 50% e 25% não apresentaram diferença significativa; a concentração de 10% diferiu das demais (Figura 1B). Comparando os cimentos, OZO obteve atividade antimicrobiana significativamente maior em todas as concentrações, com exceção de 10% (Figura 1B).

Os dois tipos de cimentos demonstram uma atividade antifúngica contra *C. albicans* dependente da concentração. Entretanto, OZO foi mais efetivo contra esse fungo (Figura 1C).

Figura 1- Atividade Antimicrobiana dos Cimentos



Fonte: O próprio autor

7 DISCUSSÃO

A técnica de difusão em ágar é uma das estratégias utilizadas como triagem da atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos com ação antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007; CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011). A padronização das técnicas é necessária, para viabilizar a sua reprodutibilidade e a comparação com outros estudos (PACKER; LUZ, 2007). Dessa forma, baseando-se na metodologia descrita e na comparação com os controles, os resultados desta pesquisa são válidos e podem ser comparados a outros.

O papel das bactérias no início da inflamação pulpar e periapical tem sido bem demonstrada. O sucesso do tratamento endodôntico é diretamente influenciado pela eliminação de microrganismos que contaminam os canais radiculares. É bem conhecido que microrganismos que colonizam o ambiente bucal podem ser propícios para desencadear patologias pulpais e periapicais (ERCAN et al., 2006). Um número de estudos relatam sobre a composição microbiana da polpa dental necrótica, em um canal radicular infectado, onde um ou mais agentes patogênicos bacterianos podem ser isolados, (PINHEIRO et al., 2003).

Com o intuito de comparar o efeito antimicrobiano dos produtos testados, realizou-se a determinação da CIM, na qual as substâncias foram avaliadas em concentrações seriadas sobre o estado de suspensão dos microrganismos. A técnica para determinação da CIM empregada neste estudo foi baseada nos protocolos e normas estabelecidas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para avaliação da sensibilidade de leveduras e bactérias aeróbias à terapia antimicrobiana. Os métodos de referência estabelecidos pelo NCCLS padronizam técnicas de microdiluição para determinação da sensibilidade de leveduras e de bactéria de crescimento aeróbico à terapia por antimicrobianos. Esses protocolos consideram a avaliação de agentes antimicrobianos sintéticos, a utilização do meio de cultura RPMI-1640 ou do Caldo Muller Hinton, e a padronização da concentração inicial das substâncias testadas em 1024, 64 ou 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (NASCIMENTO et al., 2007). Nossos resultados apresentaram que o CIM do eugenol foi de 0,31% para *E. coli*, 0,62% para *E. faecalis* e 0,16% para *C. albicans*, enquanto que o CIM do óleo de orégano foi de 0,16% para *E. coli*, 0,62% para *E. faecalis* e 0,08% para *C. albicans* (Tabela 1). Demonstrando e comprovando que ambos os óleos são efetivos contra os microrganismos testados, sendo que o óleo de orégano consegue uma

atividade antimicrobiana com menores concentrações comparadas ao eugenol contra *E. coli* e *C. albicans*.

Obras recentes que investigam a microbiota encontrada em dentes com tratamento endodôntico que falharam, têm relatado uma variedade muito limitada de microrganismos, com predominantemente espécies gram positivas facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis* (GOMES, et al., 2004; VAN WINKELHOFF; VAN STEENBERG; GRAAF, 1988; PINHEIRO et al., 2003; ERCAN et al., 2006). Visto que nos testes realizados, nossos resultados demonstram que o óleo essencial de orégano apresentou uma melhor atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas, tornando-se uma boa opção no uso clínico, evitando recidivas nos tratamentos endodônticos.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se com este trabalho que o óleo de orégano possui ótima atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados e que o cimento OZO com 50% de óleo de orégano seria a melhor escolha para uma potencial utilização na prática clínica.

REFERÊNCIAS

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446–475, Feb. 2008.

BAMMANN, L. L.; ESTRELA, C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In: ESTRELA, C. **Ciência endodôntica**. São Paulo: Artes Médica, 2004. v.1

BARBIN, D. **Planejamento e análise estatística de experimentos agrônômicos**. 2. ed. Londrina: Mecenias, 2013.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de Candida. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v.10, n. 3, p. 243-246, jul./set. 2011.

ERCAN, E. et al. Investigation of microorganisms in infected dental root canals. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 20, n. 2, p. 166-172, 2006.

ESTRELA, C. Obturação do canal radicular. In: _____. **Ciência endodôntica**. São Paulo: Artes Médica, 2004. v.1.

GOMES, B. P. F. A. et al . **Microbiological examination of infected dental root canals**. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 2, p. 71-76, Apr. 2004..

HOLLENBACH, C. B. et al. Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L . em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p. 66-71, abr./jun. 2014.

INGLE, J. I. Root canal obturation. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 47-55, Jul. 1956.

JOHNSON, W. T.; GUTMANN, L. L. Obturação do sistema de canais radiculares limpos e formatados. In: ESTRELA, C. **Ciência endodôntica**. São Paulo: Artes Médica, 2004. v.1

MARKOWITZ, K. et al. Biologic properties of eugenol and zinc –eugenol: a clinically oriented review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, Saint Louis, v. 73, n. 6, p. 730-737, Jun. 1992.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Brazilian Journal of Botany=Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.

MCELROY, Donald L. Physical properties of root canal filling materials. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 50, n. 4, p. 433-440, Apr. 1955.

MITH, H. et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**, Malden, v. 2, n. 4, p. 403-416, Jul. 2014.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan./mar. 2007.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414–420, May 2007.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.17, n. 2, p. 102-107, jan./mar 2007.

PINHEIRO, E. T. et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral microbiology and immunology**, v. 18 n. 2, p. 100-103, Apr. 2003.

SUNDE, P. et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **Journal of Endodontics**, New York, v. 28, n. 4, p. 304-310, Apr. 2002.

THOMPSON, D. C.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; MOLDEUS, P. Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 137-147, 1991.

VAN WINKELHOFF, A. J.; VAN STEENBERGEN, T. J. M.; GRAAFF, J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 145-155, Mar. 1988.