



**FAPAC - FACULDADE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS
INSTITUTO TOCANTINENSE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS PORTO S.A.
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**ALBÉRIO BATISTA DE OLIVEIRA
THALES GUSTAVO MENEZES SANTANA FERREIRA**

**ANÁLISE *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE *Costus
spiralis* (COSTACEAE) SOBRE *Enterococcus faecalis***

**PORTO NACIONAL-TO
2020**

**ALBÉRIO BATISTA DE OLIVEIRA
THALES GUSTAVO MENEZES SANTANA FERREIRA**

**ANÁLISE *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE *Costus
spiralis* (COSTACEAE) SOBRE *Enterococcus faecalis***

Artigo científico submetido ao Curso de Medicina da FAPAC- Faculdade Presidente Antônio Carlos ITPAC Porto Nacional, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Medicina.

Área: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Carina Scolari Gosch

**PORTO NACIONAL-TO
2020**



ANÁLISE *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE *Costus spiralis* (COSTACEAE) SOBRE *Enterococcus faecalis*

IN VITRO* ANALYSIS OF THE ANTIBACTERIAL ACTION OF *Costus spiralis* (COSTACEAE) EXTRACT ON *Enterococcus faecalis

Albério Batista de Oliveira ¹
Thales Gustavo Menezes Santana Ferreira¹
Carina Scolari Gosch²

¹ Acadêmicas do Curso de Medicina – Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos

²Carina Scolari Gosch– Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos

RESUMO: *Enterococcus faecalis* é um importante causador de infecções endodônticas e nosocomiais, tornando importante a busca por novos fármacos antimicrobianos. Objetivo: Analisar *in vitro* a ação antibacteriana do extrato de *Costus spiralis* sobre *E. faecalis*. Metodologia: O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em ágar com poço. Cepas de *E. faecalis* (NEWProv- 0012) foram revitalizados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 18 h. Posteriormente, a suspensão microbiana foi ajustada para concentração de 5x10⁵ UFC mL⁻¹ e semeada em ágar Mueller Hinton, após, foram confeccionados poços de 6 mm. Utilizou-se a pasta do extrato alcoólico bruto de *C. spiralis*, como controle positivo hipoclorito de sódio 2,5% e como controle negativo o etanol 96% e caldo BHI. Os halos de inibição foram avaliados em triplicatas após 24 h. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a pasta do extrato bruto e soluções preparadas com caldo BHI em diferentes concentrações. A viabilidade e a quantificação microbiana de *E. faecalis* em cultura com CIM foram determinadas por diluição seriada após 24, 48 e 72 h. Resultados: O extrato bruto de *C. spiralis* tem ação efetiva na inibição do crescimento de *E. faecalis*. A CIM foi observada na concentração de 25% do extrato em solução e promoveu a inibição do crescimento de *E. faecalis* em 50% após 24 h e de 98% em 48 h de incubação. Conclusão: O extrato de *C. spiralis* tem ação antibacteriana e pode ser uma alternativa terapêutica para as infecções causadas por *E. faecalis*.

Palavras-chave: *Costus spiralis*. Plantas medicinais. Antibacterianos.

ABSTRACT: *Enterococcus faecalis* is an important cause of endodontic and nosocomial infections, making the search for new antimicrobial drugs important. Objective: To analyze *in vitro* the antibacterial action of *Costus spiralis* extract on *E. faecalis*. Methodology: The antimicrobial sensitivity test was performed using the well agar diffusion method. *E. faecalis* strains (NEWProv-0012) were revitalized in BHI broth and incubated at 37 °C for 18 h. Subsequently, the microbial suspension was adjusted to a

concentration of 5×10^5 UFC mL⁻¹ and sown on Mueller Hinton agar, after which 6 mm wells were made. The crude alcoholic extract paste of *C. spiralis* was used as a positive control 2.5% sodium hypochlorite and as a negative control 96% ethanol and BHI broth. The inhibition halos were evaluated in triplicates after 24 h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the crude extract paste and solutions prepared with BHI broth in different concentrations. The viability and microbial quantification of *E. faecalis* in culture with MIC were determined by serial dilution after 24, 48 and 72 h. Results: The crude extract of *C. spiralis* has an effective action in inhibiting the growth of *E. faecalis*. MIC was observed at a concentration of 25% of the extract in solution and promoted the inhibition of *E. faecalis* growth by 50% after 24 h and 98% in 48 h of incubation. Conclusion: *C. spiralis* extract has antibacterial action and can be a therapeutic alternative for infections caused by *E. faecalis*.

Keywords: *Costus spiralis*. Medicinal plants. Anti-Bacterial Agents.

1 INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* são caracterizados como cocos gram-positivos dispostos em forma única, em pares ou em cadeias curtas. São microrganismos anaeróbios facultativos, produtores de ácido láctico e catalase negativo (IKE, 2017). Possui capacidade de formar biofilme, podendo ser encontrado no trato gastrointestinal, cavidade oral e vagina (LEE D. *et al.*, 2019; GARCÍA-SOLACHE *et al.*, 2019). Já foram considerados microrganismos comensais inofensivos, porém, pesquisas evidenciam de forma crescente, o potencial do *Enterococcus* de sobreviver em ambiente hospitalar, colonizar pacientes e causar infecções humanas como bacteremia, peritonite, endocardite, infecção do trato urinário, sendo o *E. faecalis* responsável por mais de 90% das infecções enterocócicas (SAVA *et al.*, 2010; POCHHAMMER *et al.*, 2017; KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004).

Os *Enterococcus faecalis* parecem ter adquirido ao longo do tempo uma capacidade de acumular e compartilhar elementos cromossômicos que possuem características de codificar tanto virulência como genes de resistência a antimicrobianos, talvez isso explique sua crescente presença em ambientes hospitalares, sendo o principal grupo bacteriano relacionado a infecções nosocomiais (LEBRETON *et al.*, 2017; SHARIFI *et al.*, 2013). A espécie destaca-se por apresentar novos fenótipos resistentes a importantes antibióticos, tanto os de uso convencional, quanto contra os antibióticos de última geração, como a vancomicina, e transmitindo essa capacidade a outras espécies gram-positivas e gram-negativas, levando a sérios problemas de saúde pública e despesas econômicas (COURVALIN, 1994; LEBRETON *et al.*, 2017; NUÑEZ *et al.*, 2016; WILLEMS; BONTEN, 2007).

Em pesquisas odontológicas, os mecanismos de sobrevivência de *E. faecalis* nos canais radiculares e os métodos utilizados pela bactéria para se estabelecer nesses

sítios têm ampliado os estudos com a espécie (ALSHWAIMI *et al.*, 2016; HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990; SANTA-ROSA *et al.*, 2019;). Visto que são os principais agentes microbianos responsáveis por infecções endodônticas secundárias, destacam-se pela elevada prevalência e causas de insucessos nos tratamentos odontológicos (DELBONI *et al.*, 2017; NACIF; ALVES, 2010; SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2004).

Devido à aparição de microrganismos resistentes à ação dos medicamentos mais utilizados, houve uma crescente busca por novos agentes, objetivando-se alternativas para controlar a disseminação dessas linhagens (FRIERI *et al.*, 2017). Historicamente, muitos fármacos são oriundos de produtos naturais, e estes estão sendo cada vez mais pesquisados, em busca de aperfeiçoar as drogas já existentes e desenvolver novas classes mais eficientes (BOLDI, 2004; BRAGA; SILVA, 2015; PREETHA, 2017).

A caninha-do-brejo, *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, de ampla ocorrência na América do Sul tropical, tem sido utilizada como planta medicinal, principalmente em comunidades da região amazônica (DUARTE *et al.*, 2017; LORENZI; MATOS, 2002). Com infusões das folhas, as comunidades têm a utilizado como diurético, cicatrizante, antidiabético e contra infecções (ALBUQUERQUE, 1989; BRAGA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2015; HABSAH *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2003).

Diante dessas considerações é necessário investigar e desenvolver novas opções de antimicrobianos alternativos aos já utilizados, sendo relevante a verificação da eficácia de plantas medicinais encontradas no nosso território. Portanto, o presente estudo buscou analisar a ação antibacteriana e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro* do extrato bruto etanólico da planta *Costus spiralis* sobre *Enterococcus faecalis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas e ramos de caninha-do-brejo (*Costus spiralis* [Jacq.] Roscoe) foram coletadas, seguindo as técnicas de herborização de Fidalgo & Bononi (1984), na fazenda Sítio Novo, município de Divinópolis do Tocantins, na região oeste do estado do Tocantins, Brasil, entre as coordenadas geográficas 9°54'32" latitude sul e 49°09'27" longitude oeste. A identificação da espécie foi realizada pelo botânico responsável pelo herbário da Universidade Federal do Tocantins *campus* Porto Nacional. As exsicatas encontram-se incorporadas à coleção do referido herbário, sob o número de registro 12098 HTO.

As folhas foram lavadas com água e secas, então trituradas e submetidas à maceração com etanol 96% por cinco dias. Após esse período o macerado foi filtrado em papel filtro e a solução etanólica concentrada em um evaporador rotativo, com temperatura controlada em 40 °C, para recuperação do solvente e obtenção do extrato bruto, com rendimento de 6,44%.

Atividade antimicrobiana

Utilizou-se uma cepa comercial de *Enterococcus faecalis* (NEWProv-0012), revitalizada em caldo BHI, incubado a 37 °C $\pm$ 2 °C em estufa bacteriológica até turvação visível (18 h). Após inoculou-se os microrganismos em placa de meio nutritivo não seletivo (água Nutriente, KASVI) pela técnica de esgotamento e foram novamente incubados à 37 °C $\pm$ 2 °C por 24 h. Para a realização dos testes, a concentração microbiana foi ajustada para a concentração de 5×10^5 UFC/mL de caldo BHI, controlados por leitura da turbidez em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm e posterior contagem de colônias em placa através da realização de diluições seriadas em solução salina a 0,95%.

Para determinar a ação antibacteriana em placas, preparou-se o ágar *Mueller Hinton* (MH, KASVI), previamente fundido, esterilizado e resfriado a 45-50 °C, em seguida, distribuído em placas de Petri de 150 mm de diâmetro até atingir uma espessura de aproximadamente 4 mm. Após obtenção de consistência sólida do ágar MH, utilizou-se *swabs* estéreis para a coleta de microrganismos na suspensão bacteriana ($\approx 5 \times 10^5$ UFC/mL) e realizou-se a técnica de semeadura de superfície nos três sentidos em cada placa, atentando-se para uma distribuição uniforme, evitando-se o crescimento de colônias isoladas. Em seguida, foram confeccionados poços com 6 mm de diâmetro, realizando-se quatro perfurações em cada placa.

A determinação da CIM foi realizada diluindo o extrato bruto em caldo *brain heart infusion* (BHI, KASVI), para preparação de soluções em diferentes concentrações: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,1%, 1,5% e 0,7%, para determinação da CIM. Como controle positivo utilizou-se hipoclorito de sódio a 2,5% e como controle negativo o etanol 96% e caldo BHI. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros. A CIM foi considerada a menor concentração da solução do extrato que possibilitou a formação de halo de inibição. Os poços foram totalmente preenchidos com quantidades suficientes de extrato bruto ou controles e incubadas a 37 °C $\pm$ 2 °C.

Após a determinação da CIM, os microrganismos ($\approx 5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹) foram cultivados em estufa bacteriológica a 37 °C $\pm$ 2 °C, na presença ou ausência do extrato

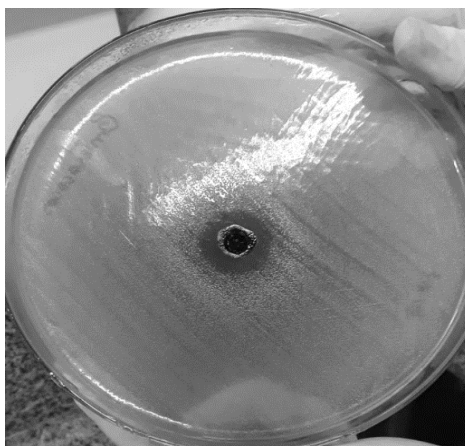
bruto de *C. spiralis* a 25%. Para análise da viabilidade e quantificação microbiana, após 24, 48 e 72 h de cultivo foi realizado a contagem de colônias em placa através da realização de diluições seriadas em solução salina a 0,95%.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Para determinar a ação antimicrobiana do extrato de *C. spiralis*, considerou-se como resultado final a média aritmética dos halos de inibição ou o número de UFC/mL obtidos de triplicatas de três experimentos realizados de forma consecutiva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que o preparado vegetal das folhas de *Costus spiralis* apresenta potencial atividade antimicrobiana contra a cepa de *Enterococcus faecalis* testada. O extrato bruto foi capaz de inibir o crescimento microbiano após 24 h de incubação, sendo observados halos de inibição, com diâmetro médio de 13 mm (Figura 1), que se mantiveram mesmo após 30 dias de cultura.

Figura 1. Teste de sensibilidade da cultura de *E. faecalis* (NP 0012) à pasta do Extrato Bruto de *C. spiralis*. Microrganismos na concentração de 5×10^5 UFC mL⁻¹ foram semeados de forma confluenta na superfície do ágar Mueller-Hinton (KASVI). Poço confeccionado no centro da placa foi preenchido totalmente com a pasta do extrato bruto de *C. spiralis* e após 2 h de pré-difusão em temperatura ambiente a placa foi incubada à 37 °C. O diâmetro do halo de inibição foi mensurado em milímetros, com auxílio de paquímetro, após 24 h e 30 dias de incubação, mantendo-se igual.



Fonte : acervo dos pesquisadores.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada com o extrato de *C. spiralis* em pasta e com soluções preparadas nas concentrações 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,2% 3,1%, 1,5% e 0,7%, (Tabela 1). A inibição do crescimento foi diretamente proporcional à concentração do extrato, sendo a CIM fixada na diluição do extrato bruto em solução de 25% em meio BHI, com formação de um halo de inibiçãode 7 mm de diâmetro.

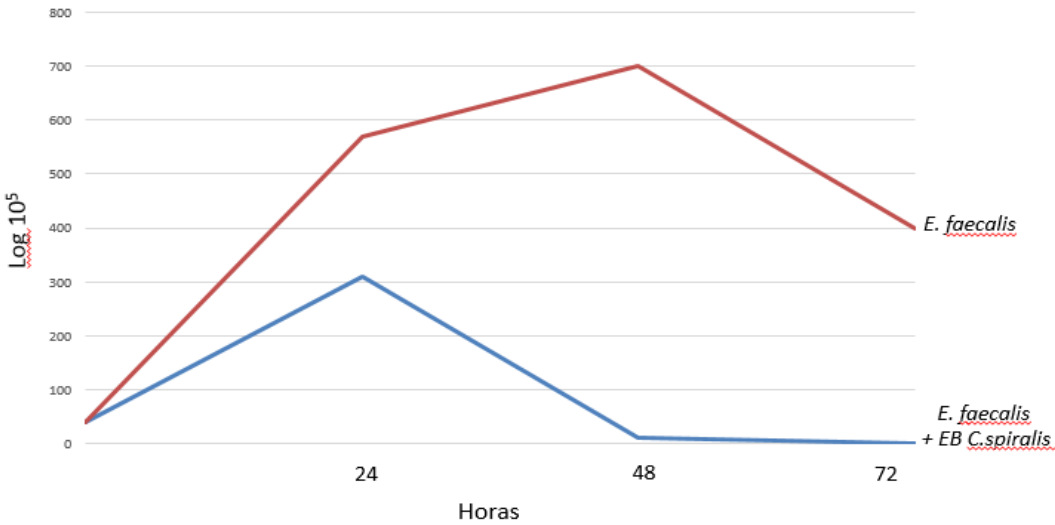
Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido do Extrato de *C. spiralis*, sobre *E. faecalis*.

Concentração do extrato (g mL ⁻¹) (%)	Medida entre a borda do poço e a margem do halo de inibição (mm)	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Extrato Bruto em pasta	3,5	13
Extrato Bruto em solução 100%	2,5	11
Extrato Bruto em solução 50%	1,5	9
Extrato Bruto em solução 25%	0,5	7
Extrato Bruto em solução 12,5%	0	0
Extrato Bruto em solução 6,2%	0	0
Extrato Bruto em solução 3,1%	0	0
Extrato Bruto em solução 1,5%	0	0
Extrato Bruto em solução 0,7%	0	0
Hipoclorito de sódio 2,5%	6,5	19
Álcool 96%	0	0
Meio BHI	0	0

Fonte : elaborado pelos pesquisadores.

A avaliação da curva de crescimento *in vitro* de *E. faecalis* na presença ou ausência do extrato bruto de *C. spiralis* na CIM 25% identificou uma redução efetiva no crescimento microbiano na presença do extrato vegetal após 24 h de cultura e que não houve mais crescimento de colônias visíveis após 48 h de incubação (Figura 2).

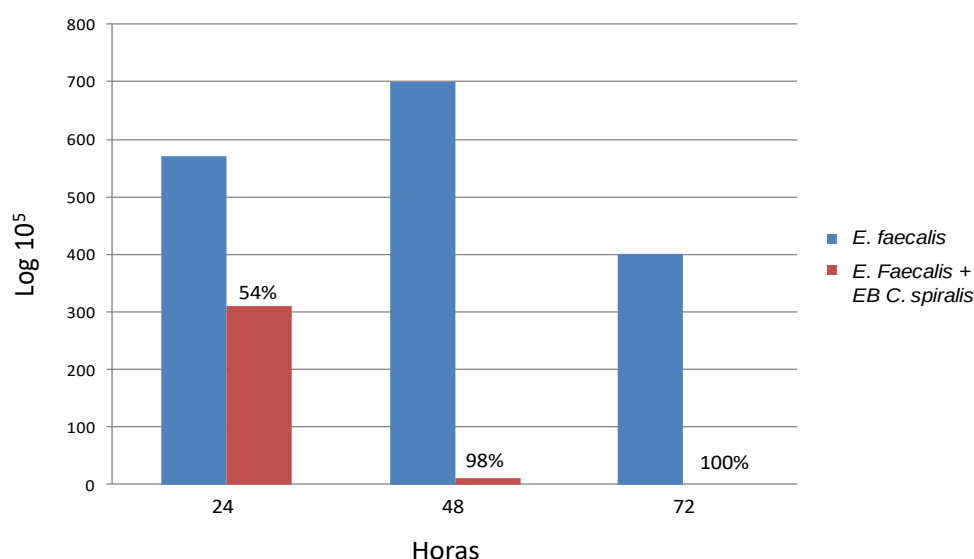
Figura 2. Curva de crescimento *in vitro* do *E. faecalis* na presença e ausência do Extrato Bruto de *C. spiralis*. Microrganismos na concentração de 5x10⁵ UFC mL⁻¹ foram cultivados em caldo BHI ou em caldo BHI + pasta do Extrato Bruto de *C. spiralis*, formando uma solução a 25% (*EB C.spiralis*), correspondente ao CIM. Após 24, 48 e 72 h de incubação em estufa bacteriológica a 37 °C, foram realizadas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁹) e respectiva semeadura em ágar não seletivo para contagem de colônias e determinação do número de UFC mL⁻¹. Fonte: elaborado pelos pesquisadores.



Fonte: elaborado pelos pesquisadores.

A taxa de inibição do crescimento microbiano na presença do extrato bruto de *C. spiralis* na CIM 25% foi comparada com o crescimento microbiano livre de qualquer fator limitante. O extrato na CIM 25% foi capaz de inibir em 54% o crescimento microbiano em 24 h, 98% após 48 h e em 72 h inibiu em 100% (Figura 3).

Figura 3. Taxa de inibição do crescimento *in vitro* de *E. faecalis* pelo Extrato Bruto de *C. spiralis*. Após a avaliação da curva de crescimento *in vitro* de *E. faecalis* na presença e ausência do Extrato Bruto de *C. spiralis* 25% (EB) foi calculado a inibição do crescimento microbiano pela presença do extrato vegetal.



Fonte: elaborado pelos pesquisadores.

As formulações com concentrações do extrato bruto da caninha-do-brejo a partir de 25% analisadas neste estudo mostraram ação frente ao *E. faecalis*. Pesquisas anteriores utilizando extrato vegetal de *Costus spiralis* mostram atividade antibacteriana *in vitro* contra diferentes bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae* e contra bacilos gram positivos, *Bacillus cereus*, (BOUZADA *et al.*, 2009; PÉREZ *et al.*, 2008). Em nenhum desses estudos a espécie *E. faecalis* foi incluída entre as cepas analisadas, não permitindo a comparação dos resultados com a presente pesquisa.

Uliana *et al.*, (2015) ao pesquisar a atividade antibacteriana de *Costus spicatus* revelou que tal ação poderia estar relacionada à presença de compostos fenólicos e flavonoides identificados no extrato. Esse potencial também pode estar relacionado à composição dos extratos metanólicos de *C. spiralis*, detentores de ambas as substâncias, tendo em vista que estudos fitoquímicos identificaram os seus principais componentes, destacando-se os alcalóides, flavonóides, esteróides, saponinas, inulina, taninos, sitosterol, mucilagens, sapogeninas, pectinas e oxalato de cálcio

(ALBUQUERQUE, 1989; BRAGA *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2017; SILVA; PARENTE, 2004). Apesar de a natureza exata dos compostos que possuem efeito antimicrobiano no extrato de *C. spiralis* serem desconhecidas, esses resultados podem ser úteis para futuros ensaios de isolamento dos princípios ativos que agem sobre as cepas.

Nos experimentos realizados por Bouzada *et al.* (2009), utilizando extrato vegetal do *C. spiralis* obtiveram como resultados halos de inibição de 10 mm contra *Shigella sonnei*, 10 mm contra *Klebsiella pneumoniae* e 9 mm contra *Pseudomonas aeruginosa* e 15 mm contra *Bacillus cereus*. No presente estudo, os halos de inibição registrados nos testes contra *E. faecalis* foram de 13 mm, sugerindo que bactérias gram positivas possam ser mais sensíveis aos princípios ativos presentes na planta.

O hipoclorito de sódio a 2,5% é uma substância de utilização global, principalmente em tratamentos endodônticos, sendo a primeira opção para irrigação dos canais radiculares, com capacidades além dos efeitos antibióticos, antifúngicos e antivirais, ainda permite clarear, desodorizar, dissolver tecidos orgânicos, possuindo baixa tensão superficial e pH alcalino (BORIN *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2018; TARTARI *et al.*, 2016;). Apesar de ser a substância de escolha por apresentar versáteis capacidades, o hipoclorito, devido seu efeito desnaturante sobre proteínas, é considerada uma substância causadora de citotoxicidade quando em contato com tecidos adjacentes ao espaço do canal radicular, podendo causar hemólise, ulceração e inibir a migração de neutrófilos (FIDALGO *et al.*, 2009; HAND *et al.*, 1978; SERMEÑO, *et al.*, 2009). Em contrapartida, Braga *et al.* (2007) ao estudarem os efeitos do extrato de *Costus spiralis* em concentração de 250 µg ml⁻¹, revelaram citotoxicidade não significativa em células de mamíferos.

A caninha-do-brejo, por sua ampla utilização como planta medicinal, foi pesquisada em outros segmentos que têm confirmado os seus efeitos terapêuticos utilizando-se de seus extratos vegetais, corroborando as suas propriedades medicinais. Destacam-se as ações hipoglicemiantes, antidiislipidêmicas e antioxidantes em experimentos com ratos (DUARTE *et al.*, 2019), ação contra *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonenses* (BRAGA *et al.*, 2007), capacidade anti-inflamatória, inibição da permeabilidade vascular, proteção cardiovascular e antiaterosclerótica (SILVA; PARENTE, 2004), e atividade antiurolitítica em cálculos renais formados por cristais de oxalato de cálcio em modelos experimentais vivos (VIEL *et al.*, 1999), validando as diversas funções medicinais presentes em uma mesma planta, e com potencial para novas descobertas, como as descritas no presente estudo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se nos estudos *in vitro* que os extratos das folhas de *Costus spiralis* possuem atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis* a partir de concentrações de 25% de extrato bruto. As evidências do presente estudo indicam uma contribuição relevante do *C. spiralis* como matéria prima para novos arsenais de substâncias antimicrobianas que venham a combater as temidas infecções por *E. faecalis*. Os resultados encorajam o desenvolvimento de novos estudos para comprovação de sua eficácia, isolamento de princípios ativos, sinergismo com outras substâncias e aplicabilidade clínica, viabilizando o seu uso como substância auxiliar nos tratamentos futuros .

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, J. M. Plantas medicinais de uso popular. **Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior (ABEAS)**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1989. 96p.
- ALSHWAIMI, E.; BOGARI, D.; AJAJ, R.; AL-SHAHRANI, S.; ALMAS, K.; MAJEED, A. In vitro antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. **Journal of Endodontics**, [S.l.], v.42, n.11, p.1588-1597, 2016.
- BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S.l.], v.8, n.3, p.281-286, 2004.
- BORIN, G.; BECKER, A. N.; OLIVEIRA, E. P. M. A história do hipoclorito de sódio e a sua importância como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares. **Rev Endod Pesq Ens on-line**, [S.l.], n.5, p.1-5, 2007.
- BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. M.; KONNO, T. U.; DUARTE, G. G.; SCIO, E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical biology**, [S.l.], v.47, n.1, p.44-52, 2009.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. D. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v.111, n.2, p.396-402, 2007.
- BRAGA, M. D.; SILVA, C. M. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. **Unimontes Científica**, [S.l.], v.9, n.1, p.91-98, 2015.
- COURVALIN, P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother**, [S.l.], v.38, n.7, p.1447-1451, 1994.
- DELBONI, M. G.; GOMES, B. P.; FRANCISCO, P. A.; TEIXEIRA, F. B.; DRAKE, D.

Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of endodontics**, [S.l.], v.43, n.3, p.377-382, 2017.

DUARTE, R. C.; TALEB-CONTINI, S. H.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. F.; MIRANDA, C. E. S.; BERTONI, B. W.; ... PEREIRA, A. M. S. Effect of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves, methanolic extract and guajaverino blood glucose and lipid levels in a type II diabetic rat model. **Chemistry & Biodiversity**, [S.l.], v.16, n.1, e1800365, 2019.

DUARTE, R.; ANDRADE, L.; OLIVEIRA, T. Revisão da planta *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe: Pluralidade em propriedades medicinais. **Revista Fitos**, [S.l.], v.11, n.2, p.119-249, 2017.

FERREIRA, A. L. S.; BATISTA, C. A. S.; PASA, M. C. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola Mata Cavalo em Nossa Senhora do Livramento – MT, Brasil. **Biodiversidade**, [S.l.], v.14, n.1, p.151-160, 2015.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. **São Paulo: Instituto de Botânica**, São Paulo, 1984.

FIDALGO, T. K. D. S.; BARCELOS, R.; PETRÓPOLIS, D. B.; AZEVEDO, B. R.; PRIMO, L. G.; SILVA FILHO, F. C. Citotoxicidade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. **Revista Gaúcha de Odontologia**, [S.l.], v.57, n.3, p.317-321, 2009.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, [S.l.], v.10, n.1, p.369-378, 2017.

GARCÍA-SOLACHE, M., & RICE, L. B. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology**. [S.l.], v.32. 2019.

GOMES, F. A.; SANTIAGO, N. S.; SENA, F. M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, C. M.; ROCHA, V. G. A.; PAPPEN, F. G. Capacidade da dissolução tecidual do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações Capacity of sodium hypochlorite tissue dissolution in different concentrations. **RSBO**, [S.l.], v.15, n.2, p.101-107, 2018.

HAAPASALO, M., ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **Journal of Dental Research**, [S.l.], v.66, n.8, p.1375-1479, 1987.

HABSAH, M.; AMRAN, M.; MACKEEN, M. M.; LAJIS, N. H.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; ALI, A. M. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v.72, n.3, p.403-410, 2000.

HAND, R. E.; SMITH, M. L.; HARRISON, J. W. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. **J Endod.**, [S.l.], v.4, n.2, p.60-64, 1978.

IKE, Y. Pathogenicity of enterococci. Nihon saikingaku zasshi. **Japanese journal of bacteriology**, [S.l.], v.72, n.2, p.189–211, 2017.

KAYAOGU G.; ORSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, [S.l.], v.15, p.308-20, 2004.

LEBRETON, F.; MANSON, A. L.; SAAVEDRA, J. T.; STRAUB, T. J.; EARL, A. M.; GILMORE, M. S. Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. **Cell**, [S.l.], v.169, n.5, p.849–61, 2017.

LEE, D., IM, J., NA, H., RYU, S., YUN, C.-H., & HAN, S. H. The novel enterococcus phage vb_efas_hef13 has broad lytic activity against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. **Front microbiol.**, [S.l.], v.10, n.2877, 2019.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarium**, [S.l.], 511 p. 2002.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLIANI, D.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais. 5º Reimpressão**, Viçosa: Editora UFV, v.220, 2003.

NACIF, M. C. A. M.; ALVES, F. R. F. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Rev. Bras. Odontol.**, [S.l.], v.67, n.2, p.209-214, 2010.

NUÑEZ, L.; TORNELLO, C.; PUENTES, N.; ESPIGARES RODRÍGUEZ, E.; MORENO ROLDÁN, E.; ESPIGARES GARCÍA, M.; MORETTON, J. Hospital effluent constitutes a source of vancomycin-resistant enterococci. **Ars Pharm**, [S.l.], v.57, n.3, p.121-126, 2016.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressing of experimentally infected dentinal tubules. **Endod. Dent. Traumatol**, [S.l.], v.6, n.4, p.142-149, 1990.

PÉREZ, C.; FALERO, A.; HUNG, B. R.; LEDÓN, T.; FANDO, R. Antibacterial effect of *Costus spiralis* leaves extract on pathogenic strains of *Vibrio cholerae*. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, [S.l.], v.39, n.1, p.70-72, 2008.

POCHHAMMER, J., KRAMER, A., & SCHÄFFER, M. Enterokokken und postoperative Wundinfektionen. **Der Chirurg**, [S.l.], v.88, p.377–384. 2017.

PREETHA, S. P. In silico methods for herbal research. **Tanuvass**, [S.l.], p.133-137, 2017.

SANTA-ROSA, C. C.; ARAÚJO, C. V.; DE CARVALHO, M. F. F.; ARAÚJO, P. V. Estudo piloto da análise comparativa da atividade antimicrobiana da PDT e agentes irrigantes em canais radiculares inoculados com *Enterococcus faecalis* “in vitro”. **Arquivos em Odontologia**, [S.l.], v.55, 2019.

SAVA, I. G.; HEIKENS, E.; HUEBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.l.], v.16, n.6, p.533-540, 2010.

SERMEÑO R. F.; BEZERRA, A.; HERRERA, H.; HERRERA, H.; SILVA, R. A. B.; LEONARDO, M. R. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, [S.l.], v.108, n.1, p.46-49, 2009.

SHARIFI, Y.; HASANI, A.; GHOTASLOU, R.; NAGHILI, B.; AGHAZADEH, M.; MILANI, M.; BAZMANY, A. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v.3, n.1, p.197–201, 2013.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus spiralis*. Zeitschriftfur Naturforschung, **Section C: Journal of Biosciences**, [S.l.], v.59, n.1-2, p.81-85, 2004.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, [S.l.], v.97, n.1, p.85-94, 2004.

TARTARI, T.; BACHMANN, L.; MALIZA, A. G. A.; ANDRADE, F. B.; DUARTE, M. A. H.; BRAMANTE, C. M. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. **J Appl. Oral Sci.**, [S.l.], v.24, n.3, p.291-298, 2016.

ULIANA, M. P.; DA SILVA, A. G.; FRONZA, M.; SCHERER, R. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Costus spicatus* swartz used in folk medicine for urinary tract infection in Brazil. **Lat Am J Pharm**, [S.l.], v.34, p.766-72, 2015.

VIEL, T. A.; DOMINGOS, D. C.; SILVA, A. P. M.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v.66, n.2, p.193-198, 1999.

WILLEMS, R. J. L.; BONTEN, M. J. M. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, [S.l.], v.20, n.4, p.384-390, 2007.