

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-BIOLÓGICA  
DE IRRIGANTES EXPERIMENTAIS À BASE DE  
ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**LUCAS DORNA DE PAULA**

**SÃO PAULO**

**2023**

**LUCAS DORNA DE PAULA**

**FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-BIOLÓGICA  
DE IRRIGANTES EXPERIMENTAIS À BASE DE  
ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Pires Rodrigues.

**SÃO PAULO**

**2023**

Paula, Lucas Dorna de.

Formulação e caracterização físico-biológica de irrigantes experimentais de canais radiculares à base de óleo essencial de melaleuca / Lucas Dorna de Paula. - 2023.

22 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Biomateriais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Pires Rodrigues.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivana Barbosa Suffredini.

1. Endodontia. 2. Melaleuca. 3. Antioxidantes.  
4. Irrigação de canal radicular. 5. *Enterococcus faecalis*.  
I. Rodrigues, Flávia Pires (orientadora). II. Suffredini, Ivana Barbosa (coorientadora). III. Título.

**LUCAS DORNA DE PAULA**

**FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-BIOLÓGICA  
DE IRRIGANTES EXPERIMENTAIS À BASE DE  
ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Pires Rodrigues

Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Grazieli Corrêa

Universidade Paulista - UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. André Guaraci De Vito de Moraes

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo-USP

“Para atravessar o mar, coloque o pé na água.  
Pra chegar ao outro lado, você precisa acreditar.  
Deus quer abrir o mar pra você.  
Mas, antes, você precisa crer.”

Laura Moreno

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus: “Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36).

À minha mãe que sempre sonhou comigo cada sonho de minha vida, incluindo o meu sonho de se tornar mestre, e nunca mediu esforços para me ver feliz e me tornar realizado.

À minha família, minha base, meu chão!

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, professora e amiga, Dr<sup>a</sup>. Flávia Pires Rodrigues, que acreditou em meu potencial desde a graduação e sempre me estimula a ser melhor. Agradeço por ter me apresentado à internacionalização, viver experiências únicas e marcantes nos diversos países com os quais colaboramos. Você é um exemplo de professora e espero um dia conseguir atribuir a meus alunos o tanto de conhecimento e benfeitoria que me fizeste. Serei eternamente grato por tudo e por tanto!

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia representado pela Universidade Paulista-UNIP e coordenado pela professora Dr<sup>a</sup>. Cintia Helena Coury Saraceni, por ceder todo espaço físico para a minha aprendizagem.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini e Dr. Lucas de Paula que, com muito empenho e dedicação, correalizaram e viabilizaram os experimentos laboratoriais e análises estatísticas do meu trabalho.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Cristina Lúcia Feijó Ortolani e Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini, por aceitarem o convite em participar da banca do exame de qualificação e tanto agregarem ao novo texto.

Ao professor Dr. André Guaraci De Vito de Moraes e professora Dr<sup>a</sup>. Mônica Grazieli Corrêa, por aceitarem o convite em participar da banca de defesa e, juntos, fecharmos com chave de ouro esse processo maravilhoso.

A cada professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-UNIP) que participou de minha formação.

À biomédica Karen Cristina Comin Maldonado e ao farmacêutico Ms. Sérgio Alexandre Frana, por terem correalizado e viabilizado alguns dos testes laboratoriais e pela paciência na explicação de cada processo.

*To my international friends, Prof. Manuela Sonja Killian, Dr. Matheusz Jan Marczewski, Dr. Swathi Naidu Vakamulla Raghu, Prof. Santiago Daniel Palma and Dr. Sofia Gisella Brignone for their research collaboration. I learned a lot from you, and I loved visiting your country and getting to know different cultures. I will certainly be 'a better Lucas'*

*after each experience by your side. Special thanks to Prof. Manuela Sonja Killian and Dr. Swathi Naidu Vakamulla Raghu for co-authoring my second article collaborating with the physical tests of my microemulsions and with an extra article, not included in my defence.*

Aos eternos BIGDERS Camila Rossi Sugino, George Lamacchia, Jussara dos Santos Jorge Giorgi e Luciana Fernandes de Oliveira pelos momentos únicos que compartilhamos. Nunca serão esquecidos!

Ao meu amigo Antônio Carlos da Silva Filho, por sempre nos receber com tanta hospitalidade em sua residência, provendo mais do que precisávamos.

Aos meus amigos que compartilharam disciplinas, pelo companheirismo e suporte: Alessandra Fabri Maricato, Anna Paula Ribeiro Salvador Ferraz, Camila Orlinda Andrade Gusmão, Driany Tamami Yamashita de Carvalho, Eduardo Colella, Fabiana Dubau Cavallaro Mota, Filipe Milazzo dos Santos, Guilherme Pires de Campos Cardoso, Heide Mendonça Moreira de Souza, Isabela Rodrigues de Souza, Jussara Dos Santos Jorge Giorgi, Kleber Rosa de Almeida, Luciana Fernandes de Oliveira, Marcelo Eugênio Marino, Michelle Mazziero Macedo Chiode, Paolla Camacho Vallim, Priscila Helena de Assis, Renata Moreira Cançado, Sophia Marcondes de Andrade Pereira Santa Clara Kalil, Vanessa Inácio Celestrino e Victoria Machado de Oliveira.

A meu amigo Ecio Andre Mian: seu apoio foi ímpar durante toda essa caminhada.

A todos os funcionários da secretaria PPGO-UNIP e em especial, Maria Eduarda Ferreira Lima por sempre estarem prontos e dispostos a resolverem infindáveis assuntos acadêmicos e muitas vezes extra-acadêmicos de maneira muito eficaz e humana.

A todos que diretamente e indiretamente colaboraram com este trabalho.

Sem Deus e cada um de vocês, o meu sonho de ser Mestre em Clínica Odontológica, especificamente em Biomateriais, não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo 88887.664092/2022-00.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO GERAL .....	10
CONCLUSÃO GERAL .....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
ANEXOS.....	17

## RESUMO

**Objetivos:** Formular e caracterizar físico-biologicamente irrigantes experimentais de canais radiculares à base de óleo essencial de melaleuca a partir da comprovação da ação inibitória do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* puro (TTO 100%) perante soluções de hipoclorito de sódio a 2.5% em duas apresentações (comercial e profissional).

**Material e Métodos:** Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de quatro soluções: solução salina, TTO 100% e duas marcas comerciais de NaOCl 2,5% (P-NaOCl 2,5%, de uso profissional; e D-NaOCl 2,5%, de uso doméstico). Halos inibitórios foram medidos com paquímetro digital em ensaio de disco difusão em ágar e a densidade óptica foi obtida em ensaio de microdiluição em caldo. Após análise de variância de um fator (ANOVA) seguida de teste de Tukey observou-se que os maiores halos de inibição foram produzidos pelo D-NaOCl 2,5%, seguidos pelo TTO 100%. Os inferiores foram obtidos pelo P-NaOCl 2,5% e a menor densidade óptica para o TTO 100%, o que comprovou a sua ação inibitória favorável para a formulação de irrigantes experimentais de TTO e as suas caracterizações antimicrobianas e físicas. Em uma segunda etapa, irrigantes experimentais foram formulados em três diferentes concentrações de TTO: 2,5%, 3% e 5%. Para essas microemulsões e seus grupos controles (solução salina e hipoclorito 2.5%) foram avaliados: o potencial antioxidante por meio dos testes DPPH e  $\beta$ -caroteno, formação e crescimento de biofilme de *Enterococcus faecalis* e sua ação antimicrobiana verificada nos tempos 24 h, 5 e 1 min por contato sobre o biofilme, os pHs, as análises de tensão superficial e UV-Vis.

**Resultados:** A concentração inibitória mínima do TTO foi de 2,5%, o que viabilizou as formulações estudadas nesta pesquisa. Tanto o TTO quanto as microemulsões mostraram-se irrigantes com potenciais anti-oxidantes no teste  $\beta$ -caroteno, mas o oposto ocorreu para o teste DPPH. As microemulsões de 2,5% e 5% revelaram maior inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis*, exceto a microemulsão de 3% no teste de 1 min de contato com o biofilme. As microemulsões de 3% e 2,5% inibiram o crescimento de forma mais eficaz que o hipoclorito de sódio em 5 min. Depois de 24 h, não houve diferença estatística entre as microemulsões. A maior absorbância foi atribuída à microemulsão de 3%, região próxima do pico dos principais componentes do óleo essencial de melaleuca. Os pHs das microemulsões revelou-se ácido com valor médio de 5.6. Não houve diferença estatística entre as microemulsões para as tensões superficiais. A média foi de 42-47 mN/m.

**Conclusão:** Pode-se concluir que as microemulsões de óleo essencial de melaleuca podem ser potencialmente utilizadas como irrigantes de canais radiculares, porém outros estudos devem ser feitos para garantir a segurança desses produtos quando em contato com a dentina, assim como a efetividade de procedimentos adesivos pós-irrigação com essas substâncias.

**Palavras-chave:** Endodontia, melaleuca, antioxidantes, irrigação de canal radicular, *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

**Objectives:** To formulate and physiologically characterize experimental root canal irrigants based on tea tree oil from the confirmation of the inhibitory action of pure *Melaleuca alternifolia* essential oil (100% TTO) against 2.5% sodium hypochlorite solutions in two presentations (commercial and professional).

**Materials and Methods:** Initially, the antimicrobial activities of four solutions were evaluated: saline solution, 100% TTO, and two commercial brands of 2.5% NaOCl (P-NaOCl 2.5%, for professional use, and D-NaOCl 2.5%, for household use). Inhibitory halos were measured with a digital calliper in an agar diffusion disk assay, and optical density was obtained in a broth microdilution assay. After one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, it was observed that the largest inhibition halos were produced by D-NaOCl 2.5%, followed by 100% TTO. Lower halos were obtained by P-NaOCl 2.5%, and the lowest optical density was for 100% TTO, confirming its favourable inhibitory action for the formulation of experimental TTO irrigants and their antimicrobial and physical characterizations. In a second stage, experimental irrigants were formulated at three different TTO concentrations: 2.5%, 3%, and 5%. For these microemulsions and their control groups (saline solution and 2.5% hypochlorite), the following were evaluated: antioxidant potential through DPPH and  $\beta$ -carotene tests, formation and growth of *Enterococcus faecalis* biofilm, and antimicrobial action verified at 24h, 5min-, and 1min-contact times on the biofilm, pH, surface tension, and UV-Vis analyses.

**Results:** The minimum inhibitory concentration of TTO was 2.5%. Both TTO and the microemulsions proved to be irrigants with antioxidant potential in the  $\beta$ -carotene test, but the opposite occurred for the DPPH test. The 2.5% and 5% microemulsions showed greater inhibition of *Enterococcus faecalis* growth, except for the 3% microemulsion in the 1min-contact test with the biofilm. The 3% and 2.5% microemulsions inhibited growth more effectively than sodium hypochlorite in 5 min. After 24 h, there was no statistical difference between the microemulsions. The highest absorbance was attributed to the 3% microemulsion, close to the peak of the main components of tea tree essential oil. The pH of the microemulsions was acidic, with an average value of 5.6. There was no statistical difference between the microemulsions for surface tensions, which averaged 42-47 mN/m.

**Conclusion:** Tea tree essential oil microemulsions can potentially be used as root canal irrigants; however, further studies are needed to ensure the safety of these products when in contact with the dentin, as well as the effectiveness of adhesive procedures after irrigation with these substances.

**Keywords:** Endodontics, tea tree oil, antioxidants, root canal irrigation, *Enterococcus faecalis*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A irrigação em Endodontia é uma etapa importante para a sanificação, limpeza e descontaminação do sistema de canais radiculares, pois a falha nesse processo pode acarretar no desenvolvimento de lesões periapicais e reinfecções endodônticas, necessitando re-intervenção profissional [1-3]. Com o surgimento de novos materiais e o avanço tecnológico em Endodontia, está cada vez mais evidente a busca por substâncias químicas auxiliares que desempenham elevada ação antimicrobiana e que também sejam biocompatíveis com os tecidos periapicais adjacentes.

O NaOCl é uma substância química auxiliar amplamente conhecida que promove alta capacidade bactericida, além de ser solvente de matéria orgânica e agente clareador de tecidos dentais. Mesmo sendo considerado o padrão-ouro como irrigante em Endodontia, o seu uso em caso de extravasamento apical pelo forame radicular poderá atingir ossos e tecidos periodontais, o que ocasionará sérios danos a esses tecidos e grande desconforto para o paciente. [4-7]

Dentre os sinais e sintomas do extravasamento de NaOCl durante o atendimento odontológico estão: dor aguda, sangramento abundante imediato, edema, vermelhidão na pele, hematomas na face, sangramento nasal e, em casos severos, necrose óssea. Com a finalidade de evitar tal acidente na sessão do tratamento endodôntico, o uso de seringas novas com êmbolos livres de qualquer travamento no momento da irrigação, agulhas para irrigação com bisel lateral e cânulas apropriadas para aspiração devem ser usadas. Além disso, é necessário que a solução irrigadora seja biocompatível com os tecidos adjacentes. [8, 9].

Para evitar acidentes por extravasamento de NaOCl [10-13] e buscar melhor biocompatibilidade, outros irrigantes foram estudados, tais como: ácido etilenodiamino tetraacético, usado comumente na última irrigação que antecede a obturação, como substância quelante [14-16]; clorexidina, destacando-se do hipoclorito de sódio pela sua substantividade [17,18]; ácido cítrico [19, 20]; soluções à base de peróxidos de hidrogênio, água ozonizada [19] , própolis e óleos essenciais [20], como o de *Melaleuca alternifolia* (*Myrtaceae* Juss). [18, 21-25]

Os óleos essenciais são conhecidos por seus inúmeros benefícios, dentre eles, sua ação antiinflamatória, fungicida e bactericida [24, 25]. Estudos demonstram e comprovam a eficácia no uso do óleo essencial de melaleuca no combate ao *Enterococcus faecalis*, sendo este microrganismo a bactéria de maior virulência e importância da Endodontia [24-26]. No entanto, não há estudos que comparem a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras de hipoclorito de sódio 2.5% em suas formas profissionais (registrada e regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) e a de uso doméstico, popularmente conhecida como “cândida”. Além disso, não se sabe se formulações de microemulsões de baixas concentrações à base de óleo de melaleuca apresentariam uma alternativa de menor custo para que produtos à base deste óleo, que já possui reconhecida atividade antimicrobiana, pudessem compor o mercado de irrigantes endodônticos.

O objetivo deste trabalho, portanto, foi inicialmente (Artigo 1) avaliar o efeito antimicrobiano de um óleo essencial de melaleuca comercial frente à cultura de *Enterococcus faecalis* e comparar com soluções irrigadoras à base de hipoclorito de sódio 2.5%. Posteriormente (Artigo 2), seguimos com o objetivo de formular e sintetizar três irrigantes experimentais à base de óleo essencial de melaleuca, determinar as suas concentrações inibitórias mínimas (MICs) e as concentrações inibitórias mínimas (MBCs),

bem como mensurar sua absorvância, seus pHs, tensões superficiais e potenciais antioxidantes.

## CONCLUSÃO GERAL

Podemos concluir que o TTO 100% tem atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* tanto quanto a solução de NaOCl 2,5% de uso doméstico investigada nesse estudo e superior à P-NaOCl 2,5%, solução irrigante indicada para uso profissional, o que chama a atenção não somente para seu potencial promissor para substituir o hipoclorito de sódio, mas para a necessidade de um maior controle de qualidade, eficiência e validade desses produtos padrão-ouro. Além disso, esse estudo nos permite concluir que microemulsões à base de óleo essencial de melaleuca são promissoras substitutas do hipoclorito como irrigantes de canais radiculares, considerando a inviabilidade clínica de se utilizar o óleo essencial de melaleuca puro, embora eficiente, devido ao alto custo que seria agregado ao tratamento endodôntico. Por fim, é de extrema importância que o cirurgião-dentista opte por soluções irrigantes de canais radiculares que prezem por melhor biocompatibilidade e segurança do paciente. As microemulsões experimentais à base TTO são promissoras para uso como irrigantes de canais radiculares por apresentarem estáveis enquanto emulsões, com faixa de pH ácido e baixa tensão superficial quando comparadas ao controle. Porém, estudos futuros precisam ser realizados para avaliar o efeito dessas microemulsões sobre os tecidos dentais, especificamente sobre a dentina, sua capacidade de dissolver os tecidos contaminados pela necrose pulpar e perante estudos clínicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Godoi-Jr EP, Bronzato JD, Francisco PA, Bicego-Pereira EC, Lopes EM, Passini MR, de-Jesus-Soares A, Almeida JF, Marciano MA, Ferraz CC, Gomes BP. Microbiological profile of root canals indicated for endodontic retreatment due to secondary endodontic infections or for prosthetic reasons. Clin Oral Investig. 2023 May; 27(5): 2049-64.
2. 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: 692.
3. Tonini R, Salvadori M, Audino E, Sauro S, Garo ML, Salgarello S. Irrigating Solutions and Activation Methods Used in Clinical Endodontics: A Systematic Review. Front Oral Health. 2022 Jan; 3: 838043.
4. Al-Madi EM, Almohaimede AA, Al-Obaida MI, Awaad AS. Comparison of the Antibacterial Efficacy of *Commiphora molmol* and Sodium Hypochlorite as Root Canal Irrigants against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Evid Based Complement Altern Med. 2019 Jul.
5. de Alencar AH, de Araújo Estrela R. Antibacterial potential of 2.5% sodium hypochlorite in distinct irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm. J Contemp Dent. 2015 May; 16(5): 340-6.
6. Briseño-Marroquín B, Callaway A, Shalamzari NG, Wolf TG. Antibacterial efficacy of peracetic acid in comparison with sodium hypochlorite or chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Parvimonas micra*. BMC Oral Health. 2022 Dec; 22(1): 1-9.
7. Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B, About I. Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Aug 1; 108(2): e66-73.
8. Tenore G, Palaia G, Cioffi C, Mohsen M, Battisti A, Romeo U. Subcutaneous emphysema during root canal therapy: endodontic accident by sodium hypochlorite. Ann Stomatol. 2017 Sep; 8(3): 117.
9. van der Waal SV, van Dusseldorp NE, de Soet JJ. An evaluation of the accuracy of labeling of percent sodium hypochlorite on various commercial and professional



sources: is sodium hypochlorite from these sources equally suitable for endodontic irrigation?. *J Endod*. 2014 Dec 1; 40(12): 2049-52.

10. Guivarc'h M, Ordioni U, Ahmed HM, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium hypochlorite accident: a systematic review. *J Endod*. 2017 Jan 1; 43(1): 16-24.

11. Farook SA, Shah V, Lenouvel D, Sheikh O, Sadiq Z, Cascarini L. Guidelines for management of sodium hypochlorite extrusion injuries. *Br Dent J*. 2014 Dec 19; 217(12): 679-84.

12. Ortiz-Alves T, Díaz-Sánchez R, Gutiérrez-Pérez JL, González-Martín M, Serrera-Figallo MÁ, Torres-Lagares D. Bone necrosis as a complication of sodium hypochlorite extrusion. A case report. *J Clin Exp Dent*. 2022 Oct;14(10):e885.

13. Zairi A, Lambrianidis T. Accidental extrusion of sodium hypochlorite into the maxillary sinus. *Quintessence Int*. 2008 Oct 1; 39(9).

14. Dave AG, Mallya PL, Ballal NV, Shenoy R. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, maleic acid, and fumaric acid on postendodontic treatment root fracture toughness—An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2023 Jul 1; 26(4): 453-7.

15. Atalay I, Erişen FR. Evaluation of the effects of different chelation agents on root dentin roughness. *Aust Endod J*. 2023 Sep; 49: 71-8.

16. de Pellegrin SF, Pauletto G, Carlotto IB, Mendes AL, de Azevedo Mello P, Bier CA. Interactions Between Calcium Hypochlorite and Irrigants Commonly Used in Endodontic Practice: A Chemical Analysis. *J Endod*. 2023 May 12.

17. Girard S, Paqué F, Badertscher M, Sener B, Zehnder M. Assessment of a gel type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate. *Int Endod J*. 2005 Nov; 38(11): 810-6.

18. Susila AV, Sai S, Sharma N, Balasubramaniam A, Veronica AK, Nivedhitha S. Can natural irrigants replace sodium hypochlorite? A systematic review. *Clin Oral Investig*. 2023 Feb; 27(5): 1831-49.

19. Agarwal S, Tyagi P, Deshpande A, Yadav S, Jain V, Rana KS. Comparison of antimicrobial efficacy of aqueous ozone, green tea, and normal saline as irrigants in pulpectomy procedures of primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2020 Apr 1; 38(2): 164-70.

20. Bhavani GD, Rathod T, Parveen N, Tirupathi P, Dharavattu P, Sekhar VS, Sharma D, Anlesteffy SG, Rathod Sr T, Anuradha B, Utkarsh K. Assessment of the Antimicrobial Effectiveness of Herbal Root Canal Irrigants (Propolis, *Triphala*, and *Aloe Vera*) and Chlorhexidine Against *Enterococcus Faecalis*. *Cureus*. 2023 Jul 10; 15(7).
21. Setia R, Bajaj N, Bhola M, Brar GS. Comparative Evaluation of Smear Layer Removal Efficacy of Neem Leaf Extract, Propolis, and Orange Oil when used as Endodontic Irrigants: An *in vitro* Scanning Electron Microscopic Study. *Contemp Clin Dent*. 2023 Apr 1; 14(2): 128-34.
22. Mokhtari H, Eskandarinezhad M, Barhaghi MS, Asnaashari S, Sefidan FY, Abedi A, Alizadeh S. Comparative antibacterial effects of ginger and marjoram extract versus conventional irrigants on mature *Enterococcus faecalis* biofilms: An *in vitro* study. *J of Clin Exp Dent*. 2023 Apr; 15(4): e304.
23. Agrawal V, Kapoor S, Agrawal I. Critical review on eliminating endodontic dental infections using herbal products. *J Diet Suppl*. 2017 Mar 4; 14(2): 229-40.
24. Qi J, Gong M, Zhang R, Song Y, Liu Q, Zhou H, Wang J, Mei Y. Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on *Enterococcus faecalis* and biofilm *in vitro*. *J Ethnopharmacol*. 2021 Dec 5; 281: 114566.
25. Sadr Lahijani MS, Raoof Kateb HR, Heady R, Yazdani D. The effect of German chamomile (*Marticaria recutita L.*) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia L.*) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J*. 2006 Mar; 39(3): 190-5.
26. Thawre S, Joshi R, Bhardwaj SB, Bhushan J. Comparison of the antibacterial efficacy of teatree oil, nisin and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *Mater Today: Proc*. 2020 Jan 1; 28: 1477-80.

## ANEXOS



### Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising  
quality control for your products.

Customer : doTERRA International  
Lot Number : 2230222  
Date Filled : 01/22/2023

Column : ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)  
Instrument : Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra  
Carrier gas : Helium 80 psi  
Temperature ramp : 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius  
Split ratio : 30:1  
Sample preparation : 5%w/v solution with Dichloromethane.



#### Comments:

The analysis of this Melaleuca lot revealed no contaminants or adulteration.  
The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of Melaleuca alternifolia.

Analysied by : Ambika Poudel  
Reviewed by : Dr. Prabodh Satyal



© Copyright 2023 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Aromatic Plant Research Center  
230 N 1200 E STE 100  
Lehi, UT 84043  
www.aromaticplant.org



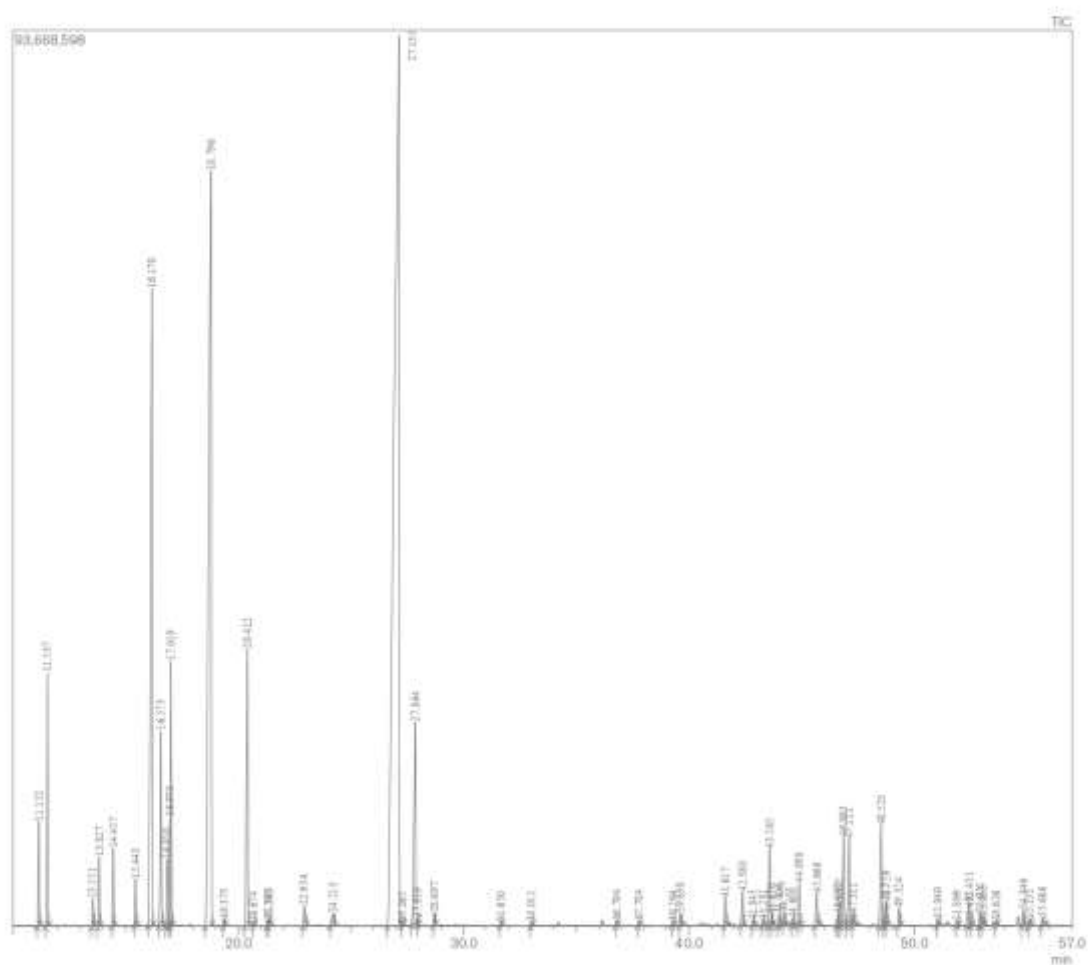
## Melaleuca Essential Oil

Customer : doTERRA International

Lot Number : 2230222

Date Filled : 01/22/2023

### Chromatogram



© Copyright 2023 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Aromatic Plant Research Center  
230 N 1200 E STE 100  
Lehi, UT 84043  
www.aromaticplant.org



## Peak Report

Peak#	RTTime	Name	Area%
1	11.152	alpha-Thujene	0.88
2	11.537	alpha-Pinene	2.21
3	13.551	Sabinene	0.25
4	13.827	beta-Pinene	0.64
5	14.457	Myrcene	0.72
6	15.443	alpha-Phellandrene	0.47
7	16.170	alpha-Terpinene	10.18
8	16.573	para-Cymene	2.06
9	16.850	Limonene	0.84
10	16.975	beta-Phellandrene	1.00
11	17.019	1,8-Cineole	2.46
12	18.796	gamma-Terpinene	18.65
13	19.375	cis-Sabinene hydrate	0.07
14	20.412	Terpinolene	3.53
15	20.674	para-Cymenene	0.03
16	21.335	Linalool	0.05
17	21.363	trans-Sabinene hydrate	0.09
18	22.934	cis-para-Menth-2-en-1-ol	0.29
19	24.213	trans-para-Menth-2-en-1-ol	0.22
20	27.135	Terpinen-4-ol	42.07
21	27.265	para-Cymen-8-ol	0.04
22	27.864	alpha-Terpineol	3.25
23	27.939	cis-Piperitol	0.05
24	28.697	trans-Piperitol	0.14
25	31.650	Piperitone	0.04
26	33.011	trans-Ancardol glycol	0.04
27	36.794	delta-Elemene	0.06
28	37.784	alpha-Cubebene	0.06
29	39.294	Isodrene	0.06
30	39.630	alpha-Copaene	0.16
31	41.617	beta-Masilene	0.34
32	42.380	beta-Caryophyllene	0.43
33	42.843	trans-cis-Caryophyllene	0.06
34	43.281	alpha-Masilene	0.06
35	43.585	Acomadendrene	1.05
36	43.670	Bourbon-11-ene	0.10
37	44.006	Selina-5,11-diene	0.13
38	44.227	trans-Murola-3,5-diene	0.15
39	44.908	alpha-Humulene	0.09
40	44.898	allo-Acomadendrene	0.54
41	45.686	cis-Cadin-1(6),4-diene	0.41
42	46.630	delta-Selinene	0.11
43	46.572	beta-Selinene	0.21
44	46.863	Vindilone	1.21
45	47.111	Bicyclogermacrene	1.18
46	47.311	alpha-Murolene	0.16
47	48.523	delta-Cadinene	1.35
48	48.715	trans-Calamenene	0.11
49	48.759	Zonarene	0.28
50	49.324	trans-Cadin-1,4-diene	0.22
51	51.040	Epiglobulol	0.10
52	51.899	Spathulolol	0.05
53	52.431	Globulol	0.30
54	52.495	Glecol	0.03
55	52.921	Vindilolol	0.17
56	53.063	Cubeben-11-ol	0.12
57	53.626	Roodolol	0.06
58	54.846	1-epi-Cubanol	0.21
59	55.131	iso-Spathulolol	0.08
60	55.686	Cubanol	0.11
			100.00



© Copyright 2023 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.



## Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising  
quality control for your products.

Customer : doTERRA International  
Lot Number : 2210774  
Date Filled : 03/11/2021

Column : ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)  
Instrument : Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra  
Carrier gas : Helium 80 psi  
Temperature ramp : 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius  
Split ratio : 30:1  
Sample preparation : 5%w/v solution with Dichloromethane.



### Comments:

The analysis of this Melaleuca lot revealed no contaminants or adulteration.  
The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of *Melaleuca alternifolia*.

Analysied by : Ambika Poudel  
Reviewed by : Dr. Prabodh Satyal



© Copyright 2021 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Aromatic Plant Research Center  
230 N 1200 E STE 100  
Lehi, UT 84043  
www.aromaticplant.org



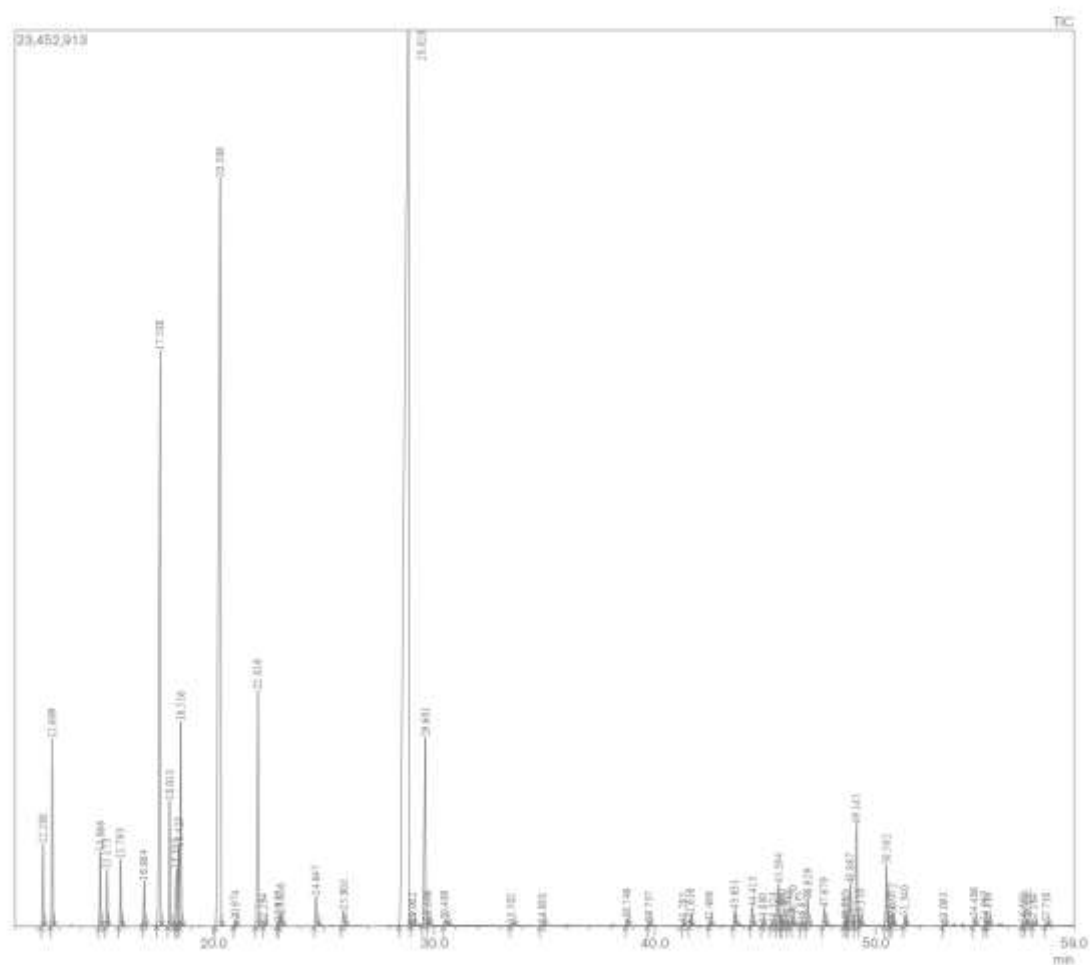
## Melaleuca Essential Oil

Customer : doTERRA International

Lot Number : 2210774

Date Filled : 03/11/2021

### Chromatogram



© Copyright 2021 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Aromatic Plant Research Center  
230 N 1200 E STE 100  
Lehi, UT 84043  
www.aromaticplant.org



## Peak Report

Peak#	RTTime	Name	Area%
1	12.280	alpha-Thujene	0.91
2	12.699	alpha-Pinene	2.16
3	14.866	Sabinene	0.91
4	15.173	beta-Pinene	0.70
5	15.793	Myrcene	0.82
6	16.884	alpha-Phellandrene	0.58
7	17.588	alpha-Terpinene	10.13
8	18.013	para-Cymene	1.65
9	18.310	Limonene	0.82
10	18.423	beta-Phellandrene	1.11
11	18.516	1,8-Cineole	2.60
12	20.308	gamma-Terpinene	18.83
13	20.974	cis-Sabinene hydrate	0.08
14	22.016	Terpinolene	3.54
15	22.294	para-Cymenene	0.03
16	22.937	Linalool	0.06
17	23.036	trans-Sabinene hydrate	0.21
18	24.647	cis-para-Menth-2-en-1-ol	0.49
19	25.902	trans-para-Menth-2-en-1-ol	0.33
20	28.828	Terpinen-4-ol	42.89
21	29.002	para-Cymen-8-ol	0.06
22	29.601	alpha-Terpineol	3.34
23	29.696	cis-Piperitol	0.05
24	30.489	trans-Piperitol	0.10
25	33.502	Pipitone	0.04
26	34.888	trans-Ancardol glycol	0.04
27	38.746	delta-Elemene	0.12
28	39.737	alpha-Cubebene	0.06
29	41.285	Isotodene	0.04
30	41.616	alpha-Copaene	0.13
31	42.496	beta-Elemene	0.06
32	43.631	beta-Maslene	0.26
33	44.413	beta-Caryophyllene	0.32
34	44.880	B-epi-cis-Caryophyllene	0.04
35	45.324	alpha-Muurolene	0.04
36	45.594	Aromadendrene	0.72
37	45.680	Bourbon-11-ene	0.06
38	45.797	alpha-Guaiene	0.03
39	46.048	Methyl-4(12)-ene	0.09
40	46.250	trans-Muurol-3,5-diene	0.16
41	46.652	alpha-Humulene	0.06
42	46.929	allo-Aromadendrene	0.43
43	47.679	cis-Cadin-1(6),4-diene	0.30
44	48.615	delta-Selinene	0.07
45	48.712	Guai-1(10),11-diene	0.13
46	48.867	Vindiflorene	0.79
47	49.145	Bicyclogermacrene	1.75
48	49.310	alpha-Muurolene	0.12
49	50.502	delta-Cadinene	1.00
50	50.685	trans-Calamenene	0.04
51	50.772	Zonarene	0.20
52	51.340	trans-Cadin-1,4-diene	0.16
53	53.093	Epiglobulol	0.04
54	54.486	Globulol	0.14
55	54.987	Vindilol	0.08
56	55.119	Cubeben-11-ol	0.05
57	56.892	Eudesmol isomer	0.06
58	56.892	1-epi-Cubanol	0.11
59	57.164	iso-Spathulol	0.04
60	57.738	Cubanol	0.06
			100.00



© Copyright 2021 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.