

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

SANDRIANE MORENO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *EX VIVO* DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
ASSOCIADA À *Curcuma longa* **SOBRE** *Candida albicans* E
*Enterococcus faecalis***

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(ABRIL/2020)

SANDRIANE MORENO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *EX VIVO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADA À *Curcuma longa* SOBRE
Candida albicans E *Enterococcus faecalis***

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleide V. B. Martins

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Kérley B. P. B. Casaril e Prof^a. Dr^a. Conceição de Fátima A. Olguin

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(ABRIL/2020)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Moreno, Sandriane

Avaliação in vitro e ex vivo da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada à Curcuma longa sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* / Sandriane Moreno; orientador(a), Cleide Viviane Buzanello Martins; coorientador(a), Kérley Braga Pereira Bento Casaril, coorientador(a)II, Conceição de Fátima Alves Olguin, 2020.

102 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2020.

1. Endodontia. 2. Curcuma. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. *Candida albicans*. I. Martins, Cleide Viviane Buzanello. II. Casaril, Kérley Braga Pereira Bento. III. Olguin, Conceição de Fátima Alves . IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SANDRIANE MORENO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *EX VIVO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADA À *Curcuma longa* SOBRE
Candida albicans E *Enterococcus faecalis***

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleide Viviane Buzanello Martins
UNIOESTE – Campus Toledo

Membro da banca: Prof^a. Dr^a. Franciele Ani Caovilla Follador
UNIOESTE – Campus Francisco Beltrão

Membro da banca: Prof. Dr. Emyr Stringhini Júnior
CENTRO UNIVERSITÁRIO UNISEP – Campus Francisco Beltrão

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Abril/2020

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus e ao universo, pela vida e por todas as possibilidades que nela existem.

À minha família, por estar sempre presente e me apoiando nestes anos.

Meus queridos e amados Everaldo e Pedro Henrique, gratidão pelo apoio, paciência, compreensão e carinho neste período.

À Prof^a. Dr^a. Cleide Viviane Buzanello Martins, pela orientação deste trabalho, por abraçar a ideia e dividir comigo sua experiência. Gratidão por todo seu ensinamento, pela compreensão e paciência.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Kérley B. P. B. Casaril e Conceição de Fátima A. Olguin Kérley pela co-orientação deste trabalho.

Ao meu querido colega e amigo prof. Dr. Emyr Stringhini Júnior, por todo ensinamento e considerações para o fortalecimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Carolina Panis, gratidão por sua contribuição e enriquecimento desta pesquisa.

Às Prof^{as}. Franciele A. C. Follador e Léia C. Lucio e a assistente Andréia A. de Rosso pelo apoio nestes anos; bem com aos professores integrantes do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde pelos ensinamentos repassados a mim, os quais contribuíram muito em minha formação.

Minhas queridas Katiana, Caroline e Elaine, muito aprendi com vocês sobre o mundo da microbiologia!! Minha gratidão.

Aos demais colaboradores da UNIOESTE, muito obrigada.

À minha querida colega de mestrado, de profissão e minha amiga, Juliana André. Toda a minha gratidão a você, esteve do início ao fim me incentivando e apoiando para a concretização deste sonho.

Aos meus colegas Ana Carolina, Angela, Caroline e Marcelo por toda a ajuda e apoio nestes anos.

Aos meus colegas de mestrado, por todos os momentos que juntos passamos e que muito aprendemos.

À minha querida Érika Luriko Hamada, gratidão por toda sua ajuda, sempre presente nos momentos em que eu mais precisei. Você mora em meu coração.

À minha querida Márcia Camichia, por todo seu apoio e bom humor do início ao fim do mestrado!

Aos meus eternos alunos e agora colegas de profissão Lucas A. Marmith, Alana C. Nesi e João Pedro Bueno Mathias pela ajuda e apoio neste trabalho, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Aos colegas docentes, colaboradores e às direções da UNISEP, por todo apoio e ajuda.

Prof. Leandro, por sua contribuição com seus conhecimentos estatísticos.

À minha colega Alexandra Gehlen, coordenadora de saúde bucal do município de Francisco Beltrão e aos profissionais da área odontológica, em especial ao meu colega Jakson P. Antonelli, por toda ajuda e apoio nesta pesquisa. Minha gratidão!

À empresa Eurodonto/TDK, em especial à colaboradora Catarina Lima, pelo fornecimento de material endodôntico para a realização da pesquisa, muito obrigada!

Romeu e Ignês Saggin, por fornecer os rizomas da cúrcuma para a realização deste trabalho. Gratidão.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Everaldo Macagnan e ao meu filho Pedro Henrique Moreno Macagnan, pelo amor incondicional para comigo. Amo vocês ao infinito e além!!

Aos meus pais, pelos ensinamentos que a mim passaram, como a responsabilidade, honestidade e firmeza de caráter, por meio dos quais me senti segura para trilhar meu caminho.

As minhas queridas irmãs, vocês são mulheres maravilhosas, meu carinho e admiração e por serem brilhantes profissionais.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Curcuma longa</i> . (A) Planta. (B) Rizomas.....	24
Figura 2	Estrutura da curcumina.....	25
Figura 3	Fluxograma do processo para obtenção do óleo essencial e extratos da <i>Curcuma longa</i>	32
Figura 4	(A) Óleo essencial extraído em aparelho Clevenger. (B) Resíduos secos dos rizomas.....	33
Figura 5	Impregnação da substância no disco de papel estéril.....	34
Figura 6	Discos impregnados com as substâncias.....	35
Figura 7	Teste de concentração inibitória mínima (CIM) <i>Enterococcus faecalis</i> . (A) Placa 1. (B) Placa 2.....	38
Figura 8	Teste de concentração inibitória mínima (CIM) <i>Candida albicans</i> . (A) Placa 1. (B) Placa 2.....	38
Figura 9	Leitura visual para o teste da CIM <i>E. faecalis</i> . (A) Placa 1. (B) Placa 2.....	39
Figura 10	Leitura visual para o teste da CIM <i>C. albicans</i> . (A) Placa 1. (B) Placa 2.....	39
Figura 11	Subcultivos para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). (A) CBM <i>E. faecalis</i> . (B) CFM <i>C. albicans</i>	39
Figura 12	Protocolo para dentes extraídos.....	44
Figura 13	Dentes extraídos. (A) Unirradiculares. (B) Radiografia.....	44
Figura 14	Preparo dos espécimes. Os dentes para o estudo tiveram o seu comprimento padronizado por meio de marcações (A) e que após as secções ficou com um intermediário de raiz de 8 mm de extensão (B e C). O diâmetro dos canais foi padronizado com a broca de Gates-Glidden #4 em toda a sua extensão (D e E). Para eliminação da <i>smear layer</i> os espécimes foram submetidos a banho ultrassônico em EDTA 17% e NaOCl a 5,25% (F, G e H) por 4 minutos. Os espécimes tiveram a superfície externa coberta com adesivo epóxi (I e J) e numerados (K).....	46

Figura 15	Espécimes acondicionados em tubos de microcentrífuga.....	47
Figura 16	(A e B) Espécimes após autoclavagem e incubados em estufa por 48 horas mostrando a ausência de turbidez do meio.....	47
Figura 17	(A) Espécimes em caldo inoculado com os micro-organismos. (B) Turbidez do meio de cultura.....	48
Figura 18	Substâncias selecionadas como medicação intracanal. (A) Ca(OH)_2 P.A. (B) Clorexidina gel 2%. (C) Ca(OH)_2 , propilenoglicol e extrato de <i>C. longa</i>	50
Figura 19	(A) Irrigação com solução fisiológica estéril. (B) Gaze e cone de papel estéril para a secagem dos canais.....	50
Figura 20	Aplicação das medicações. (A) Extravasamento da medicação. (B) Cimento restaurador provisório. (C e D) Cimento restaurador aplicado no espécime. (E) Espécimes alojados em placas de 24 poços. (F) Hidratação com solução fisiológica estéril. (G) Placas separadas por grupos de medicações.....	51
Figura 21	Aplicação das medicações. (A) Ambiente estéril. (B) Remoção do cimento restaurador provisório. (C) Irrigação com solução fisiológica estéril. (D) Secagem com cones de papel estéril.....	52
Figura 22	Coleta das amostras. (A) Brocas de Gates Glidden acionadas a motor. (B) – Gates-Glidden #5 e #6. (C) Raspas de dentina.....	53
Figura 23	Plaqueamento das amostras. (A) Placas ágar BHI. (B) Placas de ágar SBD. (C) Micropipetadora. (D e E) Alça de Drigalski.....	54
Figura 24	Substâncias utilizadas no teste de hemólise. (A e B) Clorexidina. (C e D) Hidróxido de cálcio. (E e F) Óleo essencial. (G e H) Extrato etanólico. (I e J) Solvente (DMSO+metanol).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Micro-organismos e substâncias utilizados para o teste de disco-difusão.....	34
Tabela 2	Porcentagem da substância na combinação hidróxido de cálcio e extrato etanólico.....	42
Tabela 3	Combinação do hidróxido de cálcio e extrato etanólico em $\mu\text{g/mL}$	42
Tabela 4	Concentrações* dos compostos/produtos investigados para uso em tratamento de canal, submetidos ao perfil de hemólise para determinar suas toxicidades.....	43
Tabela 5	Distribuição e agrupamento dos espécimes em função do micro-organismo e medicação a serem avaliados.....	49
Tabela 6	Substâncias neutralizadoras recomendadas em função das medicações intracanaís avaliadas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Controle de crescimento
CE	Controle de esterilidade
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CFM	Concentração fungicida mínima
CFO	Conselho Federal de Odontologia
CHX	Clorexidina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Controle de toxicidade
DAP	Pasta dupla antibiótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIC	Concentração inibitória fracionária
FICI	Índice concentração inibitória fracionária
MH	Muller Hinton
N	Newton
NaOCl	Hipoclorito de sódio
nm	Nanômetro
P.A.	Pró-análise
PCR	Reação da polimerase em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	“Roswell Park Comprehensive Cancer Center”
SBD	Sabouraud dextrose

TA	Termo de assentimento
TAP	Pasta tripla antibiótica
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TSA	Ágar triptona de soja
UFC/mL	Unidade formadora de colônias por mililitros

Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada à *Curcuma longa* sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*

Resumo

Patologias pulpares e perirradiculares são causadas pela presença e persistência de micro-organismos no sistema de canais radiculares. Neste sentido, a necropulpectomia tem como finalidade erradicar ou ao menos reduzir os micro-organismos mais prevalentes nas lesões apicais persistentes, como o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*. Com o aumento dos efeitos colaterais e a resistência antimicrobiana aos medicamentos convencionais a utilização de produtos naturais extraídos das plantas tem sido uma alternativa amplamente explorada nas diversas áreas da saúde. Dentre esses, destacam-se os produtos da *Curcuma longa*, devido a sua ação antimicrobiana. Na endodontia, buscam-se alternativas para soluções irrigadoras e medicamento intracanal. Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar, *in vitro* e *ex vivo*, a atividade antimicrobiana da *C. longa* e suas associações frente a esses micro-organismos. Depois da extração das substâncias dos rizomas, foram realizados testes de disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo; determinando assim a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico da *C. longa* (62 µg/mL) para *E. faecalis* e *C. albicans* (32 µg/mL). A partir da CIM foi determinado o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) da combinação hidróxido de cálcio mais extrato etanólico. As combinações que obtiveram sinergismo foram (128 µg/mL + 32 µg/mL) e (96 µg/mL + 16 µg/mL) para *E. faecalis* e *C. albicans* respectivamente. Para verificar a toxicidade de algumas substâncias a serem utilizadas no teste *ex vivo*, foi realizado o teste de hemólise. O extrato etanólico apresentou a menor toxicidade, com uma taxa de hemólise de 28,18%, em relação às demais substâncias testadas. Para a realização dos testes *ex vivo* foram utilizados 120 dentes extraídos, que passaram por processo de seleção, preparo, contaminação e aplicação das medicações intracanaís. Os espécimes foram alocados aleatoriamente em quatro grupos: um para o controle negativo e os demais de tratamento. Grupo I (controle negativo:

propilenoglicol), grupo II (hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)), grupo III (clorexidina gel 2%) e grupo IV ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ com extrato etanólico da *C. longa*). Após o período de incubação dos micro-organismos, em cada espécime, foi realizada a coleta das amostras, em dois níveis de profundidade de dentina, e a contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) para cada grupo. Os dados foram analisados por meio do teste estatístico Kruskal-Wallis com o nível de significância estipulado em 5% ($P \leq 0,05$). Foi observada redução estatisticamente significativa na contagem de ufc/mL de *C. albicans* entre o grupo controle negativo e os demais grupos na profundidade mais superficial: grupo II ($P=0,02$), grupo III ($P=0,001$) e grupo IV ($P=0,02$). Somente o grupo III apresentou redução com significância estatística em relação aos demais grupos ($P=0,01$). Na porção de dentina avaliada mais internamente houve diferença estatisticamente significativa para os grupos III e IV ($P=0,01$) quando comparado com o grupo controle negativo. O extrato etanólico tem atividade antifúngica e quando associado ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ conseguiu melhorar a ação do mesmo como medicamento intracanal.

Palavras-chave: Endodontia, Curcuma, Enterococcus faecalis, Candida albicans.

In vitro* and *ex vivo* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide masses associated with *Curcuma longa* on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis

Abstract

Pulp and periradicular pathologies are caused by the presence and persistence of microorganisms in the root canal system. In this sense, a necropulpectomy can use to eradicate or lessen the microorganisms most prevalent in persistent lesions, such as *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. With the increase in effects and antimicrobial resistance to drugs used in the use of natural products extracted from plants, it was an extremely explored alternative in several areas of health. Among these, *Curcuma longa* products stand out due to their antimicrobial action. In endodontics, alternatives are sought for irrigation solutions and intracanal medications. Given this context, the objective of the present study was to analyze, *in vitro* and *ex vivo*, an antimicrobial activity of *C. longa* and its associations against these microorganisms. After extracting the substances from the rhizomes, disk diffusion tests were performed on the agar and microdilution in the heat; thus determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the ethanolic extract of *C. longa* (62 µg/mL) for *E. faecalis* and *C. albicans* (32 µg/mL). From the CIM, the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of the combination of calcium hydroxide plus ethanolic extract was determined. As combinations that obtained synergism were (128 µg/mL + 32 µg/mL) and (96 µg/mL + 16 µg/mL) for *E. faecalis* and *C. albicans* respectively. To check the toxicity of some substances used in the *ex vivo* test, a hemolysis test was performed. The ethanolic extract showed less toxicity, with a hemolysis index of 28.18%, in relation to the other tested substances. To perform the *ex vivo* tests, 120 extracted teeth were used, which were processed by selection, preparation, contamination and application of intracanal medications. The specimens were randomly allocated to four groups: one for negative control and other treatment. Group I (negative control: propylene glycol), group II (calcium hydroxide (Ca(OH)₂)), group III (chlorhexidine gel 2%) and group IV (Ca(OH)₂ with ethanolic extract of *C. longa*). After the incubation period of the microorganisms, in each

specimen, samples were collected at two levels of dentin depth and a count of colony-forming units (cfu/mL) for each group. The data were analyzed using the Kruskal-Wallis statistical test with a significance level set at 5% ($P \leq 0.05$). There was a statistically significant reduction in the cfu/mL count of *C. albicans* between the negative control group and the other groups at a more superficial depth: group II ($P=0.02$), group III ($P=0.001$) and group IV ($P=0.02$). Only group III showed a statistically significant reduction in relation to other groups ($P=0.01$). In the dentin portion evaluated more internally, there was a statistically significant difference for groups III and IV ($P=0.01$) when compared with the negative control group. The ethanolic extract has antifungal activity and when associated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ it was able to improve the action in the same way as the intracanal medication.

Keywords: Endodontics, Curcuma, Enterococcus faecalis, Candida albicans.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Microbiologia endodôntica	18
1.2 Medicação intracanal.....	20
1.3 <i>Curcuma longa</i>	24
2. OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 Obtenção do óleo essencial e extratos da <i>Curcuma longa</i>	30
3.1.1 Óleo essencial da <i>Curcuma longa</i>	30
3.1.2 Extrato etanólico – extração da cúrcuma desodorizada	31
3.1.3 Extrato aquoso	31
3.2 Reativação dos micro-organismos	31
3.3 Preparo das suspensões dos micro-organismos e das substâncias a serem testadas para a verificação de ação antimicrobiana – disco-difusão	31
3.3.1 Inóculo de <i>Enterococcus faecalis</i> para disco-difusão.....	31
3.3.2 Inóculo de <i>Candida albicans</i> para disco-difusão	32
3.3.3 Preparo das substâncias	33
3.3.4 Impregnação dos discos	34
3.4 Preparo das suspensões dos micro-organismos e das substâncias a serem testadas para verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – microdiluição em caldo	35
3.4.1 Inóculo de <i>Enterococcus faecalis</i> para microdiluição em caldo	35
3.4.2 Inóculo de <i>Candida albicans</i> para microdiluição em caldo	35
3.4.3 Preparo das soluções-mãe para os testes de microdiluição em caldo	36
3.4.3.1 Preparo das soluções-mãe – <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i>	36
3.4.3.2 Preparo das placas – <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. albicans</i> (CAN 14)	36
3.5 Índice de concentração inibitória fracionária.....	40
3.6 Teste de toxicidade das substâncias – perfil de hemólise.....	40

3.7 Protocolo para armazenamento dos dentes extraídos.....	43
3.8 Testes <i>ex vivo</i> em dentes extraídos.....	43
3.8.1 Seleção e preparo dos dentes.....	43
3.8.2 Divisão, contaminação dos espécimes e aplicação das medicações intracanaís.....	47
3.8.3 Coleta das amostras.....	51
3.8.4 Processamento das amostras para cultura microbiológica.....	53
3.9 Análise estatística.....	54
4. REFERÊNCIAS.....	55
5. Evaluation of the association of calcium hydroxide and <i>Curcuma longa</i> extract as an endodontic medication.....	65
6. APÊNDICES.....	83
7. ANEXOS.....	84
ANEXO I.....	84
ANEXO II.....	94
ANEXO III.....	97
ANEXO IV.....	98
ANEXO V.....	99

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Microbiologia endodôntica

A Endodontia é o ramo da Odontologia que se preocupa com a morfologia, fisiologia e patologia da polpa dental humana e tecidos perirradiculares. Seu estudo e prática incluem a biologia da polpa normal, etiologia, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e lesões da polpa e condições perirradiculares associadas. Quando o tecido pulpar se encontra em estado de necrose, com ou sem evidência de doença perirradicular, o tratamento endodôntico está indicado para a manutenção da saúde e promover a cura e reparo dos tecidos perirradiculares (AAE, 2013).

A necropulpectomia tem por objetivo promover a descontaminação do sistema de canais radiculares. O preparo químico mecânico auxilia na redução dos micro-organismos desse sistema, e na maioria das situações clínicas, consegue-se um prognóstico favorável com o sucesso no tratamento endodôntico e reparação tecidual.

Porém, em algumas situações, ocorre a quebra na cadeia asséptica e os microorganismos que tiveram acesso ao canal radicular durante o tratamento, entre as consultas ou após a obturação podem se alojar nos túbulos dentinários, ramificações e deltas apicais. Nesses casos, se os micro-organismos conseguirem se adaptar e proliferar, uma infecção secundária será estabelecida (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; RICUCCI; SIQUEIRA, 2011).

A infecção secundária (ou infecção pós-tratamento) ocorre como reinfecção (adquirida ou emergente), infecção remanescente (persistente) ou infecção recorrente (re-desenvolvida nos dentes após cicatrização aparente) em dentes tratados endodonticamente (HAAPASALO; UDNAES; ENDAL, 2003).

Na endodontia a infecção persistente se mantém mesmo após a utilização de medicações intracanal, das substâncias irrigadoras e da ação de instrumentos mecânicos. Assim, a maioria dos problemas endodônticos como *flare-up*, exsudação, sintomatologia persistente e fracasso endodôntico está associada à infecção persistente (NAIR et al., 1993; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2014).

A flora microbiana, encontrada tipicamente em infecções secundárias, apresenta menor diversidade de microorganismos e são capazes de sobreviver a condições adversas, como pH baixo e condições limitadas de nutrientes. Espécies como *Staphylococcus ssp.*, *Parvimonas micra*, *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Lactobacillus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Candida ssp.* e *Enterococcus faecalis* são típicas da infecção secundária (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2014).

Ao longo dos anos, a maioria dos estudos mostra que a microbiota de dentes com tratamento endodôntico com infecções persistentes consiste predominantemente de bactérias Gram-positivas, especialmente *Enterococcus faecalis* (SUNDQVIST et al., 1998; SIQUEIRA, RÔÇAS, 2004; MURAD et al., 2014).

Em muitos casos endodônticos de múltiplas sessões a contaminação do sistema de canais radiculares pode ocorrer entre as mesmas. Nesse sentido, as abordagens endodônticas com sessões únicas estão cada vez mais sendo utilizadas para evitar a contaminação desse sistema.

Sathorn et al. (2005) realizaram uma revisão sistemática e compararam a taxa de sucesso do tratamento endodôntico, pela interpretação clínica e radiográfica, nos casos de sessão única, ou múltiplas sessões com medicação intracanal de hidróxido de cálcio. Concluíram que o tratamento do canal radicular em uma única sessão parece ser um pouco mais eficaz do que em várias sessões, com uma taxa de cicatrização de 6,3%. No entanto, a diferença em relação à cura entre os dois regimes de tratamento não foi estatisticamente significativa.

Moreira et al. (2017) também realizaram um estudo comparando sessão única com múltiplas sessões. Os autores encontraram taxas de cura ou sucesso semelhantes, independentemente da pré-condição da polpa e periápice. O subgrupo da periodontite apical mostrou ligeira tendência à diminuição da incidência de complicações pós-operatórias e uma maior eficácia para a abordagem de visita única.

Nos casos de infecções persistentes, deve-se instituir um tratamento para o fracasso da abordagem anteriormente realizada, com foco nos micro-organismos presentes nesta fase.

A microbiota persistente pode ser dividida em: microbiota encontrada imediatamente após o término do tratamento endodôntico, ou seja, no momento da obturação, e microbiota de dentes com canais tratados (retratamento). A infecção persistente antes da obturação endodôntica se caracteriza por infecção única ou mista, tendo entre uma a cinco espécies por canal. Nos casos de retratamento, as características são similares, porém um pouco mais exacerbadas, e é preciso levar sempre em consideração a qualidade do tratamento endodôntico realizado. Dentes que apresentam tratamento inadequado evidenciam uma maior variedade de espécies, entre duas a trinta espécies. Em contrapartida, os dentes com tratamento endodôntico adequado apresentam entre uma a cinco espécies. O *E. faecalis* apresenta uma alta prevalência, sendo encontrado em até 90% dos casos de infecção persistente em dentes com canal tratado (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008).

Segundo Nair et al. (1990), micro-organismos semelhantes a leveduras também foram encontrados em canais radiculares de dentes obturados em que o tratamento endodôntico falhou. Isso sugere que esses micro-organismos podem ser resistentes à terapia endodôntica.

De fato, pesquisas demonstraram que *Candida* spp. são resistentes a alguns medicamentos comumente usados em endodontia (WALTIMO; SIREN; ØRSTAVIK, 1999; SIQUEIRA, 2003).

1.2 Medicação intracanal

É difícil eliminar todos os micro-organismos de um sistema de canal radicular infectado apenas com a instrumentação mecânica (PETERS et al., 2001). Portanto, numerosas medidas já foram propostas na terapia endodôntica para reduzir o número de micro-organismos do sistema de canais radiculares, incluindo variações nas técnicas de instrumentação, soluções irrigadoras e medicações intracanal (SHUPING et al., 2000).

A anatomia complexa dos canais radiculares e a inacessibilidade dos instrumentos dificultam a desinfecção. Por isso, é essencial medicar os canais com um agente antimicrobiano eficaz após a instrumentação dos mesmos. A necessidade da medicação é ainda maior nos casos de infecções endodônticas persistentes e secundárias (MENEZES et al., 2004).

As medicações intracanaís são utilizadas como coadjuvantes no tratamento endodôntico, com o intuito de reduzir os micro-organismos remanescentes e seus metabólitos e acelerar o processo de cicatrização (REZENDE et al., 2016).

O Ca(OH)_2 é uma das substâncias mais versáteis utilizada para essa finalidade (SOUZA-FILHO et al., 2008). Seu mecanismo de ação é resultado da dissociação de íons hidroxila e cálcio, com conseqüente aumento de pH, o que lhe confere ação antimicrobiana e indutora de mineralização, com possibilidade de reparo dos tecidos periapicais adjacentes (CARVALHO, 2006; MOHAMMADI; DUMMER, 2011).

A maioria dos micro-organismos patogênicos para o homem não é capaz de sobreviver em um meio extremamente alcalino. Muitas espécies microbianas isoladas de canais radiculares conseguem manter sua viabilidade até o pH próximo a 9, porém raras conseguem sobreviver com pH acima deste, como o *Enterococcus faecalis* (BYSTRÖM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985) que pode sobreviver em pH 11,5 e *Candida albicans* (WALTIMO; ØRSTAVIK; SIREN, 1999).

Como o pH do Ca(OH)_2 é de aproximadamente 12,8, praticamente todas as espécies microbianas já isoladas de canais infectados são sensíveis aos seus efeitos e eliminadas em pouco tempo, quando em contato direto com esta substância (LOPES; SIQUEIRA JÚNIOR, 2015).

Vários estudos têm confirmado que o Ca(OH)_2 realmente exerce um efeito letal sobre micro-organismos (SJÖGREN et al., 1991, CHAI et al., 2007). Contudo, este efeito apenas foi observado quando a substância era colocada em contato direto com micro-organismos, situação em que a concentração de íons hidroxila é máxima, atingindo níveis incompatíveis com a sobrevivência microbiana. Entretanto, estudos com teste de difusão em ágar demonstraram que pastas de Ca(OH)_2 em veículos inertes (como água destilada ou glicerina) foram ineficazes em inibir o crescimento de várias espécies bacterianas anaeróbias estritas e facultativas (SIQUEIRA JÚNIOR et al., 1996).

Sathorn et al. (2007) avaliaram, por meio de uma revisão sistemática, a eficácia antibacteriana do Ca(OH)_2 , utilizando técnicas de cultura, e concluíram que o mesmo tinha eficácia limitada na eliminação de bactérias do canal radicular humano.

Alguns autores insistem que *Enterococcus faecalis* é menos suscetível a Ca(OH)_2 do que outras bactérias. Pavelić et al. (1991) avaliaram o efeito antimicrobiano do Ca(OH)_2 , com base no método de difusão em ágar. Eles descobriram que o Ca(OH)_2 efetivamente inibiu o crescimento dos três micro-organismos depois de 24 horas, mas havia uma diferença na sensibilidade de cada micro-organismo, de modo que *Streptococcus mutans* foi o mais sensível, seguido da *Candida albicans* e do *Enterococcus faecalis*.

O iodofórmio (LIMA et al., 2012), o paramonoclorofenol canforado (PMCC) (SIQUEIRA et al., 2001, 2003), e a clorexidina (CHX) (EVANS et al., 2003), possuem atividade antimicrobiana e são substâncias utilizadas em associação ao Ca(OH)_2 como medicação intracanal.

A associação de Ca(OH)_2 e (CHX) a 2% tem sido utilizada como medicação intracanal com perspectivas promissoras (FERREIRA et al., 2015). Estudos demonstram que essa associação apresenta atividades antimicrobianas e reparadoras satisfatórias, além de serem eficazes contra endotoxinas presentes no canal radicular (SOARES et al., 2006).

A CHX tem sido utilizada na endodontia como substância irrigadora ou medicamento intracanal. Ela possui uma ampla gama de atividades antimicrobianas, substantividade (atividade antimicrobiana residual), menor citotoxicidade do que o hipoclorito de sódio (NaOCl), enquanto demonstra desempenho clínico eficiente, propriedades lubrificantes, ação reológica (presente no gel de apresentação, mantendo os detritos em suspensão); inibe a metaloproteinase, é quimicamente estável, é inodoro, solúvel em água, entre outras propriedades (SOUZA-FILHO et al., 2008; GOMES et al., 2009). A CHX é recomendada como alternativa ao NaOCl, especialmente em casos de ápice aberto, reabsorção, aumento do forame e perfuração radicular, devido a sua biocompatibilidade (GOMES et al., 2013).

A associação do Ca(OH)_2 e CHX, como medicação intracanal, foi avaliada por meio de uma revisão sistemática com metanálise, nos casos de falha da terapia endodôntica, frente ao micro-organismo *E. faecalis*. De acordo com as evidências disponíveis, concluiu-se que a mistura não aumenta significativamente a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, nos estudos *ex vivo*. Por isso, mais estudos *in vivo* são necessários para confirmar e correlacionar os achados deste estudo com resultados clínicos (SAATCHI et al., 2014).

A clorexidina tem efeito tóxico tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O mecanismo intrínseco subjacente à citotoxicidade induzida por ela em células eucarióticas ainda é desconhecido. Sugeriu-se que a clorexidina pode induzir a morte de fibroblastos L929 cultivados por meio do estresse do retículo endoplasmático. Ela pode provocar acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático, causando sobrecarga, resultando em estresse do retículo endoplasmático e morte celular por necrose ou apoptose. Esse estresse é um importante alvo ou indicador de morte celular induzida por esse medicamento (FARIA et al., 2009).

A citotoxicidade *in vitro* da clorexidina foi investigada em células que pudessem representar alvos comuns para sua ação, como nos procedimentos cirúrgicos, em tratamento de periodontite e peri-implantite, e elucidar seus mecanismos de ação. As linhas celulares osteoblásticas, endoteliais e fibroblásticas foram expostas a várias concentrações de clorexidina por diferentes tempos e testadas quanto à viabilidade celular e morte celular. A clorexidina afetou a viabilidade celular de maneira dependente da dose e do tempo, principalmente nos osteoblastos. Esses dados sugerem que a clorexidina é altamente citotóxica *in vitro*, assim é preciso mais cautela no seu uso em procedimentos cirúrgicos orais (GIANNELLI et al., 2008).

Agentes antimicrobianos tóxicos utilizados no canal radicular podem impedir a cicatrização dos tecidos periapicais. Alguns estudos mostraram que a clorexidina pode ser citotóxica para fibroblastos humanos, por inibição de síntese protéica (PUCHER; DANIEL, 1992); células do ligamento periodontal humano, prejudicando a reparação dos tecidos periapicais (CHANG et al., 2001), células osteoblásticas humanas (LEE et al., 2010) e células ósseas alveolares (CABRAL; FERNANDES, 2007).

Muitos estudos têm sido realizados com substâncias naturais, provenientes de plantas, com o intuito de verificar se as mesmas possuem atividades antimicrobianas quando utilizadas como medicamento intracanal, puras ou em associação com o Ca(OH)_2 (VASUDEVA et al., 2017; PEREIRA et al., 2019).

Pereira et al., (2019), em um estudo *in vitro*, compararam a atividade do Ca(OH)_2 , em dentina infectada com *E. faecalis*, associado a diferentes veículos e aditivos: extrato de própolis, CHX e PMCC. Após o tratamento, todas as amostras diminuíram a contaminação intra-dentinária e aumentaram o efeito antimicrobiano do mesmo.

Vasudeva et al., (2017), realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a desinfecção dos túbulos dentinários, de dentes humanos extraídos, com as seguintes substâncias: CHX gel a 2%, mel, gel de Aloe Vera, *Curcuma longa*, gel de Própolis e Ca(OH)₂ contra *E. faecalis*. O gel de CHX a 2% foi o mais eficaz, seguido de Própolis e *Curcuma longa*.

1.3 *Curcuma longa*

Há séculos que se utilizam ervas para prevenir e controlar doenças dentárias. O reconhecimento da saúde bucal como parte integrante do bem-estar geral das pessoas e a aprovação pelo Conselho Federal de Odontologia, em 2008, do uso de plantas medicinais para a saúde bucal são de grande importância na área odontológica (BRASIL, 2008). Assim, surgem novas alternativas de prevenção e tratamento para doenças orais, além de se poder lidar com a resistência microbiana a antibióticos e doenças oportunistas (SUBBIAH; ELANGO; JAYESH, 2019).

A *Curcuma longa* L., também conhecida como açafrão, açafrão-da-terra ou gengibre dourado, pertence à família *Zingiberaceae* e tem origem indiana. Visualmente a cúrcuma é uma planta (Figura 1) com ramificações laterais (rizoma ou raiz) (Figura 2) (SILVA et al., 2005).

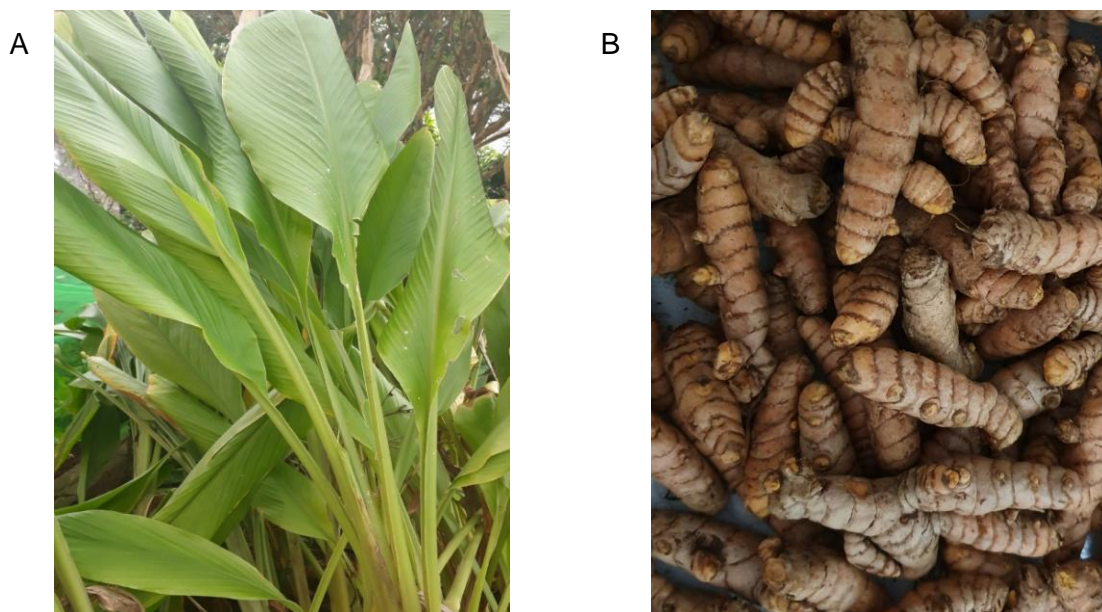


Figura 1. *Curcuma longa*. (A) Planta e (B) Rizomas.
Fonte: Autor, 2019.

A atividade biológica de *Curcuma longa* tem sido estudada por sua capacidade antibacteriana e antifúngica. Estudos comprovaram sua atividade contra diversas espécies de fungos como *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus parasiticus* e *Candida albicans* (FERREIRA et al., 2013).

A curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) - 1,6-heptadieno - 3,5-dione] foi quimicamente caracterizada em 1910 (Figura 3). É muito utilizada como corante e tempero alimentar em toda a Ásia, bem como no tratamento de várias doenças, devido ao seu potencial anti-inflamatório, antioxidante, anticarcinogênico, antiviral, antifúngico e antimicrobiano (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; GOEL; AGGARWAL, 2010; PRABHAKAR et al., 2013).

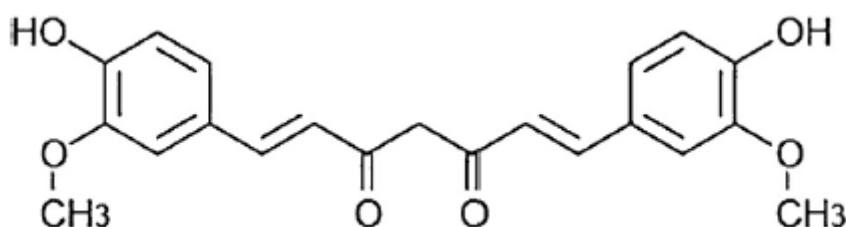


Figura 2. Estrutura da curcumina.
Fonte: Aggarwal; Harikumar, 2009.

Em estudos de inibição da adesão às células epiteliais bucais humanas de leveduras do gênero *Candida*, Martins et al. (2008) constataram que a curcumina foi 2,5 vezes mais potente que o fluconazol na inibição da adesão de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* às células do epitélio bucal.

A *Curcuma longa* é notável por sua atividade farmacológica com vários benefícios para a saúde. A curcumina tem sido reconhecida mundialmente como uma “droga milagrosa do futuro” (WAGMARE et al., 2011). As nanopartículas de curcumina possuem múltiplas atividades, como inibição da inflamação e reabsorção óssea em periodontite experimental. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a curcumina atenua a inflamação e a degradação do tecido conjuntivo na periodontite (ZAMBRANO et al., 2018).

A aplicação local de curcumina resultou em ação antimicrobiana e efeitos anti-inflamatórios, indicados por uma diminuição significativa do índice de periodontite (ELAVARASU et al., 2016). Enquanto que a aplicação tópica de

nanocurcumina age, durante o tratamento periodontal, como um adjuvante no sulco gengival de áreas comprometidas e possuem atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas (BAGHAEIAN et al., 2016).

Prabhakar et al. (2013) avaliaram e compararam a eficácia antimicrobiana do extrato aquoso da *Curcuma longa* como medicamento intracanal, contra *Enterococcus faecalis*, e seu efeito na microdureza da dentina radicular em comparação com o Ca(OH)_2 e gel de clorexidina a 2%. Foram utilizados neste estudo blocos de dentina preparados a partir de 70 dentes humanos unirradiculares extraídos, que foram padronizados. Para avaliação microbiana, esses blocos foram infectados por 21 dias com o micro-organismo *Enterococcus faecalis*. Os blocos de dentina foram tratados com Ca(OH)_2 (grupo I), gel de clorexidina a 2% (grupo II), extrato da *Curcuma longa* (grupo III) e solução salina, no grupo controle. Os autores observaram completa inibição no grupo II, 64% no grupo I e 54% no grupo III, que foi estatisticamente significativa ($P < 0,001$). Concluíram assim, que o extrato aquoso da *Curcuma longa* tem substancial atividade antibacteriana, sem efeito na microdureza da dentina radicular.

Neelakantan et al. (2013) avaliaram *in vitro* a eficácia antimicrobiana da curcumina contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* formado em dentes extraídos *in vitro* e compararam com o NaOCl e a CHX. Biofilmes de *Enterococcus faecalis* foram formados em dentes humanos instrumentados e extraídos ($n = 96$). No final do 2º dia, 2ª e 8ª semanas, os espécimes foram tratados por 30 minutos com uma das soluções teste ou soro fisiológico (controle) e as unidades formadoras de colônia sobreviventes (UFC/mL) foram registradas. Pode-se verificar que apenas o NaOCl mostrou completa erradicação de bactérias em todos os períodos. Nos biofilmes de 2 dias e 2 semanas, a curcumina e NaOCl mostraram inibição completa, enquanto as amostras tratadas com CHX e controle mostraram um crescimento bacteriano ($P < 0,05$) significativamente maior. Nos biofilmes de 8 semanas, o NaOCl demonstrou 100% de erradicação de bactérias, enquanto as UFCs sobreviventes nas amostras tratadas com a curcumina foram significativamente menores que os grupos tratados com CHX ou controle ($P < 0,05$). Pode-se concluir que o NaOCl mostrou atividade antibacteriana máxima contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* formado no substrato dentário, seguido pela curcumina e CHX e que, se considerar o potencial de propriedades

indesejáveis do NaOCl, o uso de alternativas fitoterápicas na endodontia pode ser vantajoso.

Vinothkumar et al. (2013) relatam em seu estudo que o NaOCl é o irrigante mais comumente usado, mas apresenta desvantagens como alta citotoxicidade. Então, avaliaram a eficácia de 5 extratos de ervas: *Terminalia chebula* (TC), *Myristica fragrans* (MF), *Aloe barbadensis* (AV), *Curcuma longa* (CL) e *Azadiracta indica* (AI), como irrigantes endodônticos, contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, usando a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Foram utilizados oitenta e quatro dentes extraídos e suspensos com os micro-organismos. Os autores verificaram que a *Azadiracta indica* foi altamente eficiente em relação ao NaOCl 5,25% na redução de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* dentro dos canais radiculares quando comparado com os outros extratos.

Saha, Nair e Asrani (2015), investigaram e compararam a eficácia da Própolis, do Metronidazol com o gel de CHX, da *Curcuma longa* e do Ca(OH)₂ para a eliminação da bactéria *Enterococcus faecalis* em amostras de dentes extraídos. Noventa dentes extraídos unirradiculares foram utilizados para o estudo. Após o preparo, os grupos amostrais foram infectados com cultura pura de *Enterococcus faecalis*, sob fluxo laminar, e incubados por um período de 21 dias. Os resultados mostraram que a própolis produziu a melhor eficácia antimicrobiana, seguida da combinação CHX-Metronidazol, *Curcuma Longa* e Ca(OH)₂.

Devaraj, Jagannathan e Neelakantan (2016) avaliaram *in vitro* a eficácia de cinco medicamentos intracanal contra biofilmes maduros de *Enterococcus faecalis*: curcumina ativada por luz, pasta tripla antibiótica (TAP), pasta dupla antibiótica (DAP), CHX, Ca(OH)₂. Dentes sem tratamento, mas com biofilmes, serviram como controle, e a microscopia confocal foi utilizada para analisar a massa do biofilme e a porcentagem de bactérias vivas e mortas dentro do canal radicular, bem como nos túbulos dentinários. Raspas de dentina obtidas a partir das paredes do canal radicular (a 200 e 400 microns de profundidade) foram utilizadas para quantificar as unidades formadoras de colônias/mL. Os resultados mostraram que a curcumina ativada por luz e a TAP causaram a ruptura completa da estrutura do biofilme (P<0,05), enquanto a CHX e o Ca(OH)₂ não foram significativamente diferentes do controle (P>0,05). A curcumina ativada por luz

provocou o maior percentual de células mortas em ambas as profundidades, mas isso não foi significativamente diferente da TAP ($P>0,05$). Ainda, a curcumina, a TAP e a DAP provocaram redução significativa de UFC/mL em ambas às profundidades em comparação com o controle e outros grupos ($P<0,05$).

Sendo assim, não havendo evidência científica de uma solução de irrigação ou medicação intracanal ideal para as infecções endodônticas secundárias, que atendam todos os requisitos físicos, químicos e biológicos, o objetivo deste estudo foi comparar a eficácia *in vitro* do extrato da *Curcuma longa* associado ao hidróxido de cálcio como medicação intracanal frente aos microorganismos *E. faecalis* e *C. albicans*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar, *in vitro* e *ex vivo*, a atividade antimicrobiana da *Curcuma longa* e sua associação com o Ca(OH)_2 frente a micro-organismos resistentes das infecções endodônticas, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

2.2 Específicos

Verificar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da curcumina, óleo essencial, extrato aquoso e etanólico da *Curcuma longa* frente à *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*;

Determinar a concentração inibitória fracionária do Ca(OH)_2 e do extrato etanólico contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.

Investigar, *ex vivo*, a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Curcuma longa* em associação com Ca(OH)_2 , como tratamento, em canais radiculares contaminados com *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, em dentes extraídos.

3. METODOLOGIA

Os micro-organismos utilizados no presente estudo foram, um isolado clínico de *Enterococcus faecalis*, do Instituto de Ciências e Tecnologia, da UNESP/São José dos Campos e as leveduras *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida albicans* (CAN14).

Para os testes de atividade antimicrobiana *in vitro* foram utilizados, puros e/ou associação, curcumina (Sigma e comercial), Ca(OH)₂ P.A. (Biodinâmica), CHX líquida (Farmácia Fórmula Ativa – Francisco Beltrão – PR); óleo essencial e extratos: etanólico e aquoso, obtidos de rizomas de *Curcuma longa*. Para os testes *ex vivo*, foram utilizados: Ca(OH)₂ P.A. (Biodinâmica), CHX gel a 2% (Biodinâmica), Propilenoglicol (Levviale) e extrato etanólico, o qual teve o melhor desempenho nos testes *in vitro*.

3.1 Obtenção do óleo essencial e extratos da *Curcuma longa*

Os rizomas da *Curcuma longa* foram adquiridos de produtores rurais do município de Francisco Beltrão/PR (latitude 26°04'20"S e longitude 53°03'20"W), situados na Linha São Brás, em abril de 2019.

A higienização dos rizomas da *Curcuma longa* foi realizada por meio de lavagem manual com água corrente seguida de sanitização com imersão em água clorada (100 mg/L) por 10 minutos e enxágue com água destilada. Até o processo de extração foram mantidos sob refrigeração (CUSTÓDIO, 2014).

Os rizomas (300 gramas) foram triturados em pequenas partes e seguiram para o processo de hidrodestilação (SANTOS et al., 2004).

O processamento do açafrão da terra foi realizado conforme o fluxograma descrito na Figura 3.

3.1.1 Óleo essencial da *Curcuma longa*

O óleo essencial da *Curcuma longa* foi extraído pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger (Figura 4A). Os rizomas triturados (300 gramas) foram submetidos à hidrodestilação com 1500 mL de água destilada por

4 horas. O óleo foi separado da fase aquosa e seco com sulfato de sódio, filtrado e armazenado em recipientes de vidro opaco, mantendo-se à temperatura de 8 °C até o momento da sua utilização (MAJOLO et al., 2014; CUSTÓDIO, 2014).

O processo foi realizado no Laboratório de Química Orgânica da UNIOESTE, campus de Toledo – PR.

3.1.2 Extrato etanólico – extração da cúrcuma desodorizada

Os resíduos dos rizomas, após o processo de hidrodestilação, foram colocados em estufa de circulação de ar a 60 °C para secagem (Figura 4B). Posteriormente foi submetido à extração sólido-líquido com etanol em aparelho Soxhlet por 4 horas. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Fisatom®) (CUSTÓDIO, 2014).

3.1.3 Extrato aquoso

A fase aquosa residual, obtida após a hidrodestilação, foi concentrada em evaporador rotativo até a secura (CUSTÓDIO, 2014).

3.2 Reativação dos micro-organismos

Os micro-organismos *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Candida albicans* (CAN 14) foram reativados em ágar triptona de soja (TSA) por 18 horas em estufa a 36 °C, para bactérias e ágar sabouraud dextrose (SBD) por 24 horas em estufa a 36 °C, para leveduras.

3.3 Preparo das suspensões dos micro-organismos e das substâncias a serem testadas para a verificação de ação antimicrobiana – disco-difusão

3.3.1 Inóculo de *Enterococcus faecalis* para Disco-Difusão

De uma cultura em TSA de incubação *overnight* a 36 °C, foi feita uma suspensão em solução salina equivalente a 0,5 da Escala de McFarland (1×10^8

UFC/mL), o que em espectrofotômetro (Bioespectro[®]) é alcançado com 0.08-0.10 de Absorbância lida em 600 nm, conforme Protocolo M07-A9 (CLSI, 2012).

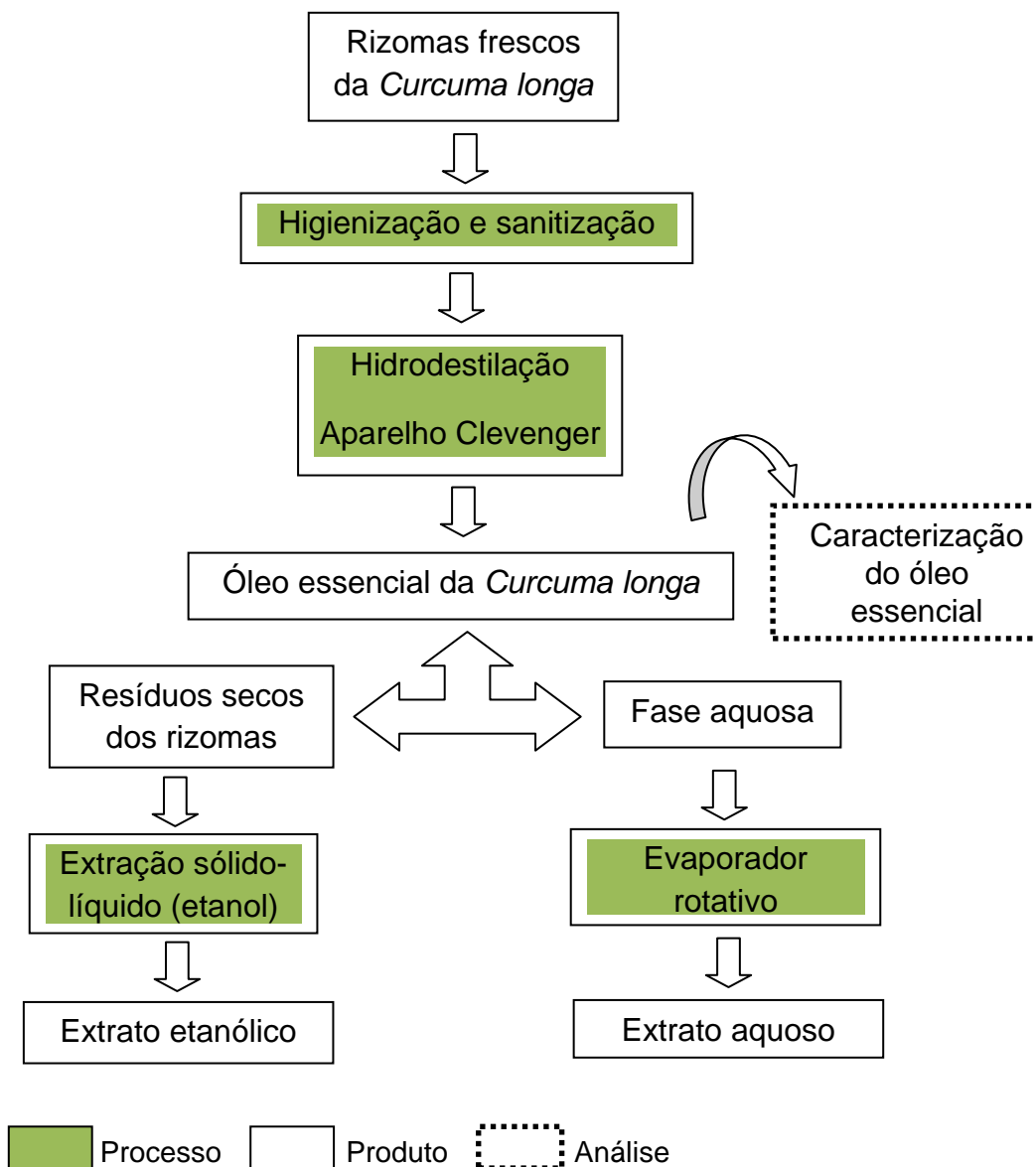


Figura 3. Fluxograma do processo para obtenção do óleo essencial e extratos da *Curcuma longa*.

Fonte: Autor, 2019.

3.3.2 Inóculo de *Candida albicans* para disco-difusão

Foram preparados 10 mL de solução salina, com uma ponta de alça de levedura, de uma cultura em ágar (SBD), de incubação *overnight* a 36°C e levado ao espectrofotômetro (Bioespectro[®]). Este foi ajustado a 75% de transmitância (530 nm), com um erro de $\pm 2\%$. Duas cubetas com 3 mL foram preparadas, uma

para ser o controle branco com salina e outra com o inóculo. Nesta transmitância, havia $0,5-5 \times 10^6$ UFC/mL, conforme protocolo M27-A2 (CLSI, 2002).

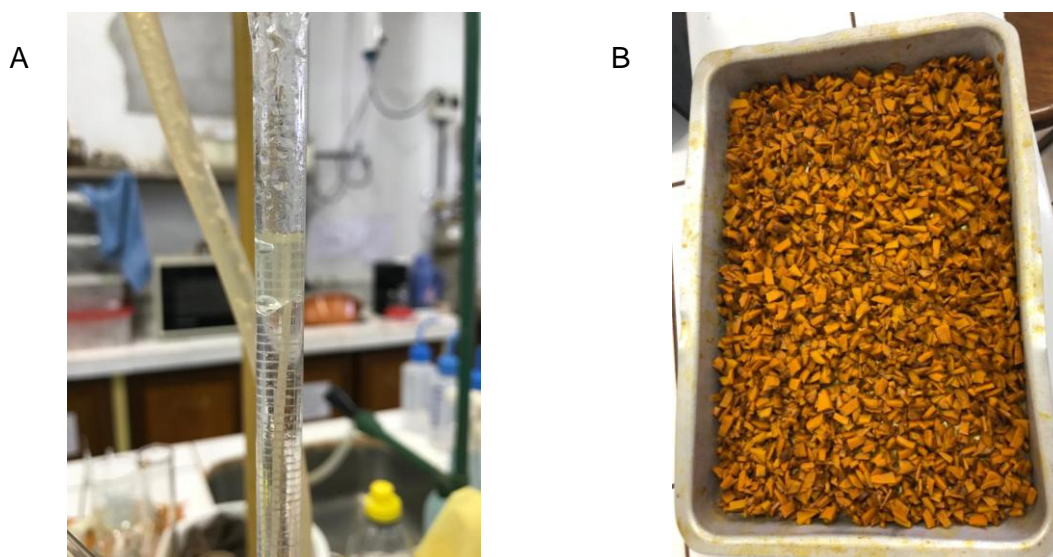


Figura 4. Óleo essencial extraído em aparelho Clevenger (A). Resíduos secos dos rizomas (B).

Fonte: Autor, 2019.

3.3.3 Preparo das substâncias

Primeiramente, foram preparadas soluções-mãe, na concentração de 10 mg/mL, com as substâncias que se apresentavam em pó: Curcumina (Sigma), Curcumina (comercial) e $\text{Ca}(\text{OH})_2$; que foram pesadas na quantidade de 10.000 μg . Como solventes, foram utilizados: metanol (980 μL) e dimetilsulfóxido (DMSO) (20 μL), para as curcuminas e água destilada estéril (1.000 μL) para o $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Para a impregnação dos discos, foram utilizadas 10 μL de cada solução-mãe em cada disco de papel estéril (Figura 5). Portanto, cada disco foi impregnado com uma quantidade de 100 μg de cada substância. As demais substâncias líquidas, extrato aquoso e extrato etanólico estavam na concentração de 10 mg/mL. Foi então utilizado 10 μL em cada disco para ficar com uma quantidade de 100 μg . Utilizou-se ainda 10 μL da solução de DMSO-Metanol (solvente) e 10 μL de CHX a 4%, esta ficou com uma quantidade de 400 μg em cada disco. Para os medicamentos: fluconazol (25 μg), cetoconazol (50 μg) e cloranfenicol (30 μg), foram preparados 5000 μg de cada em 1000 μL de água destilada, numa quantidade de 5 μL .



Figura 5. Impregnação da substância no disco de papel estéril.
Fonte: Autor, 2019.

3.3.4 Impregnação dos discos

Foram preparadas placas de Petri com os meios, Ágar Mueller Hinton para bactéria e Ágar Mueller Hinton modificado: foram acrescentados 2% de glicose + 0,5 mg de azul de metileno ao ágar Mueller Hinton, para as leveduras. Com auxílio de um swab estéril, os micro-organismos: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Candida albicans* (CAN 14) foram inoculados nos seus respectivos meios de cultura. Após 10 minutos foram colocados os discos impregnados com as soluções-mãe (Tabela 1 e Figura 6). Os testes foram feitos em duplicata.

Tabela 1. Micro-organismos e substâncias utilizados para o teste de disco-difusão.

Micro-organismos	Substâncias
<i>Enterococcus faecalis</i>	Curcumina Sigma Curcumina comercial Extrato etanólico Extrato aquoso Óleo essencial Hidróxido de cálcio Clorexidina Cloranfenicol
<i>Candida albicans</i> e <i>Candida albicans</i> (CAN 14)	Curcumina Sigma Curcumina comercial Extrato etanólico Extrato aquoso Óleo essencial Hidróxido de cálcio Clorexidina Cetoconazol Fluconazol Solvente (DMSO) + Metanol

Fonte: Autor, 2019.



Figura 6. Discos impregnados com as substâncias.
Fonte: Autor, 2019.

3.4 Preparo das suspensões dos micro-organismos e das substâncias a serem testadas para verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – microdiluição em caldo.

3.4.1 Inóculo de *Enterococcus faecalis* para microdiluição em caldo

O preparo do inóculo foi realizado conforme o item 3.3.1. A suspensão foi diluída numa escala de 1:100 em caldo Brain Heart Infusion (BHI), equivalente a 0,5 da Escala de MacFarland (5×10^4 UFC/mL).

3.4.2 Inóculo de *Candida albicans* para Microdiluição em Caldo

Após o preparo do inóculo, conforme descrito no item 3.3.2, foram feitas duas diluições em caldo RPMI-1640 (1:50 e depois 1:20). Na primeira diluição foram utilizados 980 μ L do caldo RPMI mais 20 μ L do inóculo obtido a 75% de transmitância. Desta primeira, foi realizada a segunda diluição utilizando 6.650 μ L do caldo RPMI mais 350 μ L da diluição do inóculo obtido no 1:50. Ao final das diluições foi obtido o inóculo final de $0,5 \cdot 5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.4.3 Preparo das soluções-mãe para os testes de microdiluição em caldo

Para verificar a CIM das substâncias, foram feitos os testes pelo método de microdiluição em caldo. Foram utilizadas placas com 96 poços, em duplicata, para cada micro-organismo: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Candida albicans* (CAN 14).

3.4.3.1 Preparo das soluções-mãe – *E. faecalis* e *C. albicans*

As substâncias a serem testadas foram preparadas: Curcumina Sigma e comercial (10.000 µg, dissolvidos em 980 µL de metanol e 20 µL de DMSO) para ficar na concentração de 10 mg/mL; Ca(OH)₂ (10.000 µg, dissolvidos em 1.000 µL de água destilada estéril) também com a concentração final de 10 mg/mL. As demais substâncias: extrato etanólico, extrato aquoso e óleo essencial também numa concentração de 10 mg/mL. A clorexidina utilizada foi em forma líquida a 2%. O cloranfenicol (5.000 µg) dissolvido em 1.000 µL de água destilada estéril, como controle para o *E. faecalis* e fluconazol (5.000 µg em 1.000 µL de água destilada estéril) para *C. albicans*.

3.4.3.2 Preparo das placas – *E. faecalis*, *C. albicans* e *C. albicans* (CAN 14)

Foram definidas as máximas concentrações das substâncias a serem testadas. Para todas as substâncias, a concentração utilizada foi de duas vezes a concentração teste. Curcumina (comercial e Sigma), extrato aquoso e óleo essencial da *Curcuma longa* e Ca(OH)₂ (1.024 µg/mL); extrato etanólico (256 µg/mL); clorexidina 2%, cloranfenicol (32 µg/mL) e fluconazol (32 µg/mL).

Os meios de cultura utilizados foram BHI e RPMI para *E. faecalis* e *C. albicans* respectivamente.

Foram adicionados 318 µL do meio de cultura juntamente com 82 µL da solução-mãe, obtendo-se assim a concentração desejada (curcumina comercial, curcumina Sigma, extrato aquoso e óleo essencial da *Curcuma Longa*, Ca(OH)₂ e clorexidina). Para o extrato etanólico foram adicionados 379,5 µL do meio de cultura juntamente com 20,5 µL da solução-mãe alcançando-se assim a

concentração desejada; já para o cloranfenicol e fluconazol, utilizou-se 395 μL de caldo BHI e 5 μL da solução-mãe.

Na placa 1, foram colocados 50 μL de caldo nas colunas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e fileiras B, C, D, E, F, G, exceto na fileira A. Foram adicionados 100 μL de cada substância a ser testada na concentração de 2.048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na fileira A, menos para o extrato etanólico que foi de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Com o micropipetador multicanal, foram passados 50 μL da fileira A para a fileira B, homogeneizando, e assim sucessivamente até a fileira H, sendo que 50 μL foram dispensados no final. Foram realizadas assim as diluições seriadas das substâncias, alcançando-se as concentrações em $\mu\text{g}/\text{mL}$ de: 2.048, 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, com exceção do extrato etanólico que ficou assim: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após a adição do inóculo, as concentrações finais alcançadas das substâncias ficaram no intervalo de 1.024 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com exceção do extrato etanólico, no intervalo de 256 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As colunas: 3, 6, 9 e 12 foram o controle de esterilidade (CE), com 100 μL das substâncias, sem inóculo. Em seguida, foram adicionados 50 μL do inóculo, com exceção das colunas 3, 6, 9 e 12 (Figura 7 A e B).

Na placa 2 (Figura 8 A e B), foi realizado o preparo igual ao da placa 1, com substâncias diferentes, mas nas concentrações em $\mu\text{g}/\text{mL}$ de: 2.048, 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16; que após a adição do inóculo ficaram com: 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nesta placa, o cloranfenicol e o fluconazol ficaram com as seguintes concentrações: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com: 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 após adição do inóculo. Além disso, a coluna 12 serviu como controle de toxicidade (CT) com (50 μL da solução preparada com 318 μL de caldo + 82 μL de solvente: DMSO + metanol + 50 μL do inóculo) e controle de crescimento (CC) com (50 μL de caldo + 50 μL do inóculo).

As placas 1 e 2 foram incubadas em estufa a 36 °C. Após 18 e 24 horas, foi realizada a leitura visual das mesmas (Figuras 9 A e B e 10 A e B), com a análise das concentrações das substâncias.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada aquela onde não houve crescimento visual ou onde se verificou a inibição de 50-80% do crescimento microbiano quando comparado com o controle de crescimento.

Subcultivos, com 5 µL de cada um dos poços, foram realizados em placas de ágar TSA e SBD, incubadas em 36 °C e a leitura realizada em 18/24 horas para determinar a concentração bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínima de cada substância testada, como no exemplo a seguir (Figura 11 A e B), representando o óleo essencial da *Curcuma longa* e o Ca(OH)₂ respectivamente.

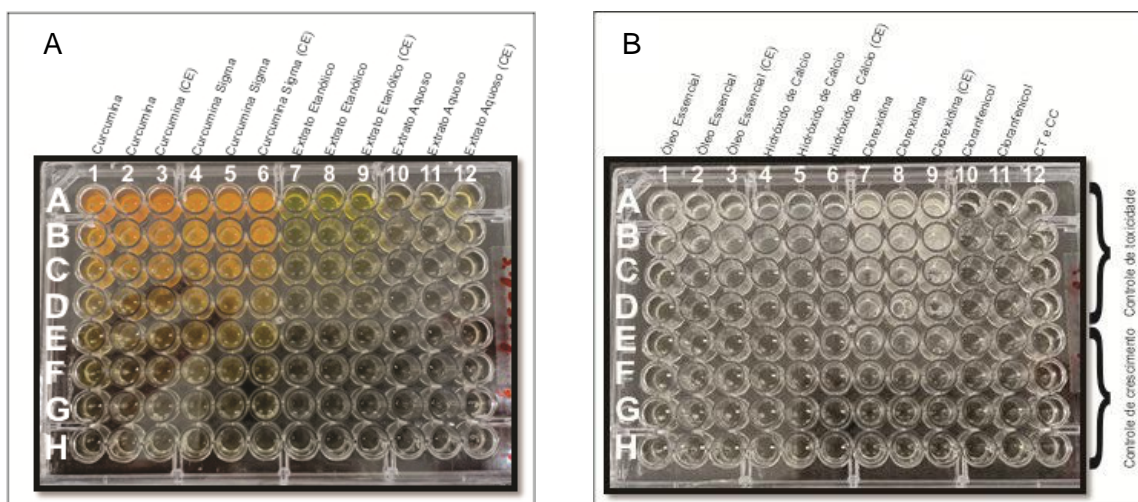


Figura 7. Teste de concentração inibitória mínima (CIM) *Enterococcus faecalis*.

(A) Placa 1. (B) Placa 2.

Fonte: Autor, 2019.

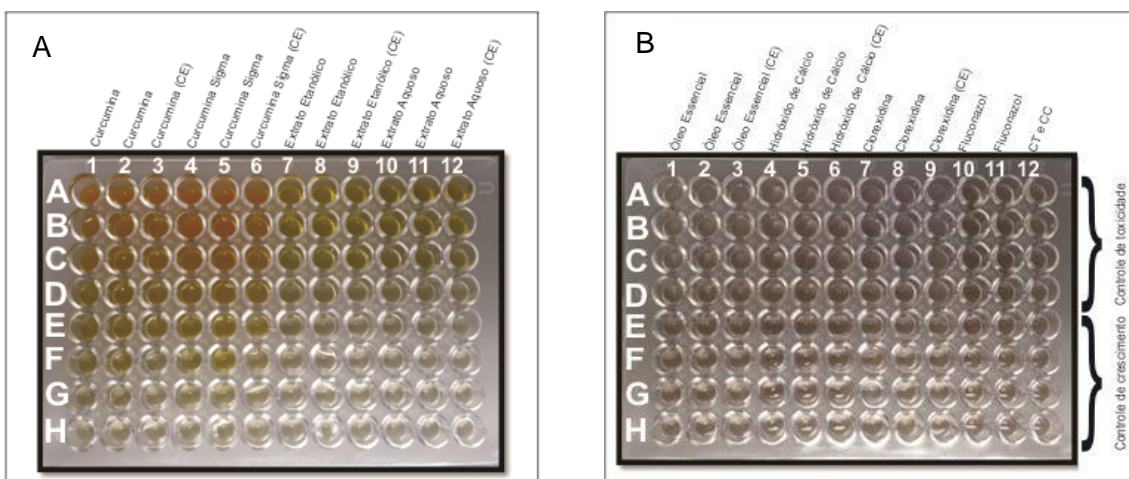


Figura 8. Teste de concentração inibitória mínima (CIM) *Candida albicans*.

(A) Placa 1. (B) Placa 2.

Fonte: Autor, 2019.

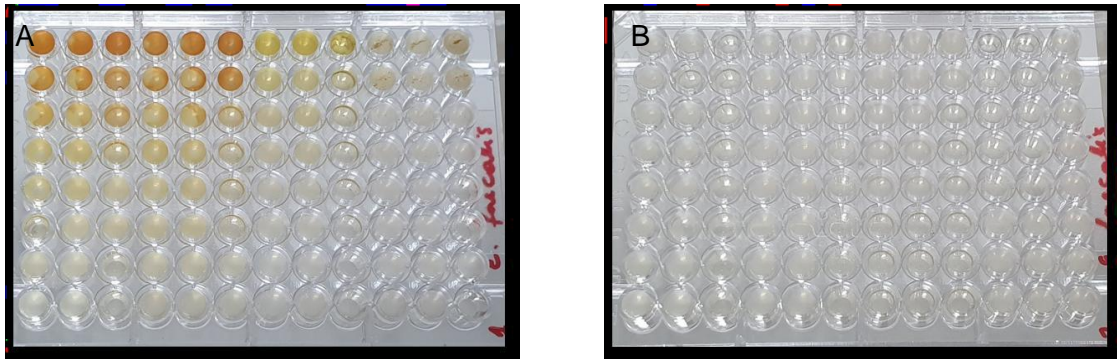


Figura 9. Leitura visual para o teste da CIM *E. faecalis*.

(A) Placa 1. (B) Placa 2.

Fonte: Autor, 2019.

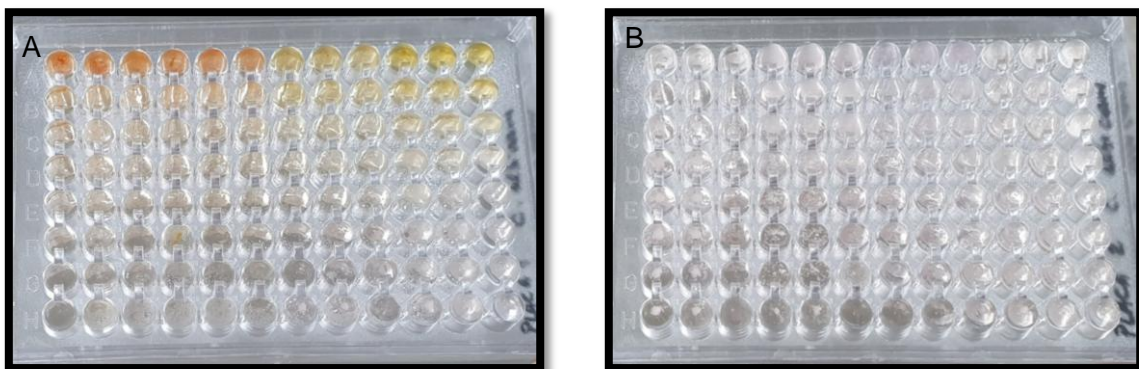


Figura 10. Leitura visual para o teste da CIM *C. albicans*.

(A) Placa 1. (B) Placa 2.

Fonte: Autor, 2019.

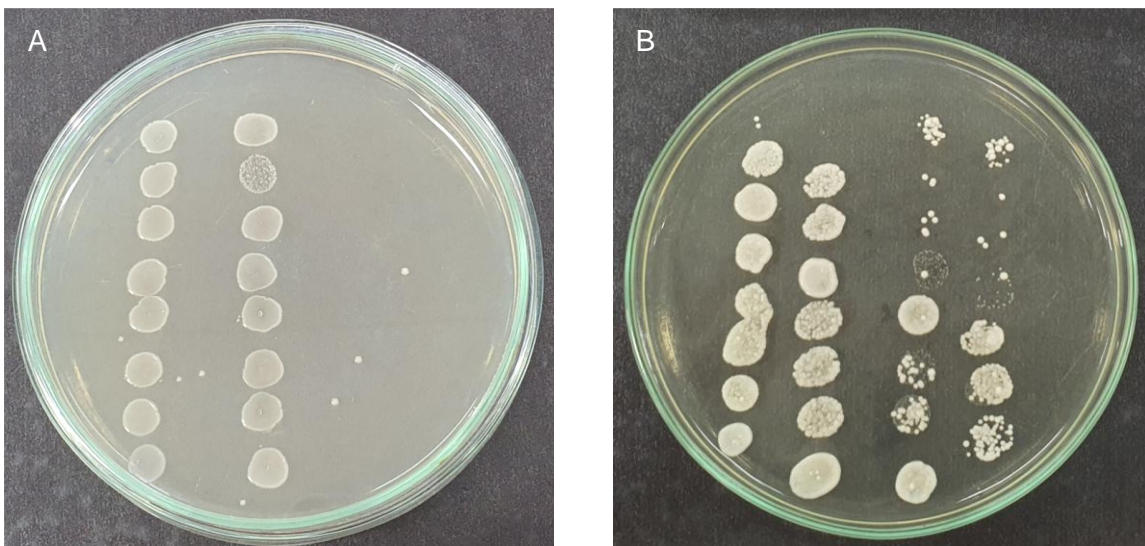


Figura 11. Subcultivos para determinar a concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM). (A) CBM *E. faecalis*. (B) CFM *C. albicans*.

Fonte: Autor, 2019.

3.5 Índice de concentração inibitória fracionária (FICI)

Com base na concentração inibitória mínima (CIM) do hidróxido de cálcio (128 µg/mL) e do extrato etanólico da *Curcuma longa* (32 µg/mL) foi determinado o índice de concentração inibitória fracionária (FICI). O FICI foi calculado usando a seguinte equação (HEMAISWARYA et al., 2008; GOMES et al., 2012):

FICI = Concentração Inibitória Fracionária (FIC) do hidróxido de cálcio + Concentração inibitória fracionária (FIC) do extrato etanólico.

Onde,

FIC do hidróxido de cálcio = CIM do hidróxido de cálcio na combinação com o extrato etanólico em relação à CIM do hidróxido de cálcio sozinho;

FIC do extrato etanólico = CIM do extrato etanólico na combinação com o hidróxido de cálcio em relação à CIM do extrato etanólico sozinho.

As combinações em porcentagem e em µg/mL estão representadas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Os testes foram feitos em duplicata para cada micro-organismo *E. faecalis* e *C. albicans*. Utilizou-se uma placa de 96 poços. As combinações das substâncias foram realizadas, colocadas em cada poço e após preparou-se os inóculos dos micro-organismos a serem testados conforme os itens 3.4.1 e 3.4.2. Após a inoculação dos micro-organismos, a placa foi incubada em estufa a 36 °C e a leitura realizada em 18 e 24 horas. Nesta leitura foram verificadas as combinações que tiveram sinergismo (ausência de crescimento do micro-organismo) ou antagonismo (presença do micro-organismo).

3.6 Teste de toxicidade das substâncias – perfil de hemólise

Foi realizado teste de hemólise das substâncias: óleo essencial e extrato etanólico da *C. longa*, hidróxido de cálcio, clorexidina e solvente (metanol e DMSO). Foram utilizadas as CIM e CFM, determinadas nos testes *in vitro*, do hidróxido de cálcio (128 µg/mL), extrato etanólico (64 µg/mL) e óleo essencial (512 µg/mL) da *C. longa* para definir as concentrações. Foram também utilizadas a clorexidina 2% líquida e solvente (DMSO e metanol), este na proporção 20:980 µL. A partir de um tubo de EDTA de sangue total, foi realizada centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após remoção do plasma, a papa de hemácias foi lavada e diluída 1:100 em soro fisiológico. Em microtubos,

as baterias dos testes foram realizadas, de modo a se obter as concentrações finais de 10x, 1x e 0,1x para cada extrato e solvente de interesse, representadas na Tabela 4. O volume final ficou em 500 μ L, obtido pela soma do volume de cada substância diluída em soro fisiológico. Após incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, as baterias foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 540 nm contra um tubo de branco contendo soro fisiológico.

Tabela 2. Porcentagem da substância na combinação hidróxido de cálcio e extrato etanólico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E.f A	(100+100)	(100+75)	(100+50)	(100+25)	(100+12,5)	(100+6,25)	(75+100)	(75+75)	(75+50)	(75+25)	(75+12,5)	(75+6,25)
E.f B	(100+100)	(100+75)	(100+50)	(100+25)	(100+12,5)	(100+6,25)	(75+100)	(75+75)	(75+50)	(75+25)	(75+12,5)	(75+6,25)
E.f C	(50+100)	(50+75)	(50+50)	(50+25)	(50+12,5)	(50+6,25)	(25+100)	(25+75)	(25+50)	(25+25)	(25+12,5)	(25+6,25)
E.f D	(50+100)	(50+75)	(50+50)	(50+25)	(50+12,5)	(50+6,25)	(25+100)	(25+75)	(25+50)	(25+25)	(25+12,5)	(25+6,25)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C.a A	(100+100)	(100+75)	(100+50)	(100+25)	(100+12,5)	(100+6,25)	(75+100)	(75+75)	(75+50)	(75+25)	(75+12,5)	(75+6,25)
C.a B	(100+100)	(100+75)	(100+50)	(100+25)	(100+12,5)	(100+6,25)	(75+100)	(75+75)	(75+50)	(75+25)	(75+12,5)	(75+6,25)
C.a C	(50+100)	(50+75)	(50+50)	(50+25)	(50+12,5)	(50+6,25)	(25+100)	(25+75)	(25+50)	(25+25)	(25+12,5)	(25+6,25)
C.a D	(50+100)	(50+75)	(50+50)	(50+25)	(50+12,5)	(50+6,25)	(25+100)	(25+75)	(25+50)	(25+25)	(25+12,5)	(25+6,25)

Tabela 3. Combinação do hidróxido de cálcio e extrato etanólico em µg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E.f A	(128+32)	(128+24)	(128+16)	(128+8)	(128+4)	(128+2)	(96+32)	(96+24)	(96+16)	(96+8)	(96+4)	(96+2)
E.f B	(128+32)	(128+24)	(128+16)	(128+8)	(128+4)	(128+2)	(96+32)	(96+24)	(96+16)	(96+8)	(96+4)	(96+2)
E.f C	(64+32)	(64+24)	(64+16)	(64+8)	(64+4)	(64+2)	(32+32)	(32+64)	(32+16)	(32+8)	(32+4)	(32+2)
E.f D	(64+32)	(64+24)	(64+16)	(64+8)	(64+4)	(64+2)	(32+32)	(32+64)	(32+16)	(32+8)	(32+4)	(32+2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C.a A	(128+32)	(128+24)	(128+16)	(128+8)	(128+4)	(128+2)	(96+32)	(96+24)	(96+16)	(96+8)	(96+4)	(96+2)
C.a B	(128+32)	(128+24)	(128+16)	(128+8)	(128+4)	(128+2)	(96+32)	(96+24)	(96+16)	(96+8)	(96+4)	(96+2)
C.a C	(64+32)	(64+24)	(64+16)	(64+8)	(64+4)	(64+2)	(32+32)	(32+64)	(32+16)	(32+8)	(32+4)	(32+2)
C.a D	(64+32)	(64+24)	(64+16)	(64+8)	(64+4)	(64+2)	(32+32)	(32+64)	(32+16)	(32+8)	(32+4)	(32+2)

Tabela 4. Concentrações* dos compostos/produtos investigados para uso em tratamento de canal, submetidos ao perfil de hemólise para determinar suas toxicidades.

Teste	10x	1x	0,1x
Óleo essencial (µg/mL)	5120	512	51,2
Extrato etanólico (µg/mL)	640	64	6,4
Hidróxido de cálcio (µg/mL)	1280	128	12,8
Clorexidina (%)	20	2	0,2
Solvente (%)	25		

*1x corresponde à concentração inibitória mínima dos produtos frente à *C. albicans* e *E. faecalis*, determinados por microdiluição em caldo.

Fonte: Autor, 2019.

3.7 Protocolo para coleta e armazenamento dos dentes extraídos

A utilização dos dentes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade do Oeste do Paraná - UNIOESTE (CEP parecer número 3.362.737).

Foram utilizados 120 dentes humanos extraídos por diversas indicações e que tenham sido doados pelos pacientes após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE e Termo de Assentimento – TA (para adolescentes com idade maior ou igual a 13 anos e menor ou igual a 18 anos). Esses TCLEs e TAs foram entregues nas Unidades Básicas de Saúde, setor de Odontologia, consultórios particulares e na FEFB/UNISEP; todos no município de Francisco Beltrão, no Estado do Paraná.

Conforme os dentes foram coletados, passaram por um protocolo de limpeza e armazenamento. Com a utilização de curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, IL-EUA) as superfícies externas das raízes foram limpas de possíveis restos de tecido periodontal ou ósseo que estivessem aderidos. Todos os dentes seguiram um protocolo de limpeza e armazenamento (Figura12).

3.8 Testes *ex vivo* em dentes extraídos

3.8.1 Seleção e preparo dos dentes

Foram utilizados para este estudo, 120 dentes humanos extraídos, que permaneceram estocados em água destilada estéril, sob refrigeração, até o início de sua preparação. Dentes unirradiculares, com um único canal, ápice radicular

completo e raízes retas ou com discreta curvatura apical foram selecionados para participarem do estudo. Incisivos inferiores foram excluídos devido ao achatamento no sentido mesiodistal. Todos os dentes selecionados foram radiografados para verificar se o canal encontrava-se livre de calcificações ou bifurcações (Figura 13 A e B).

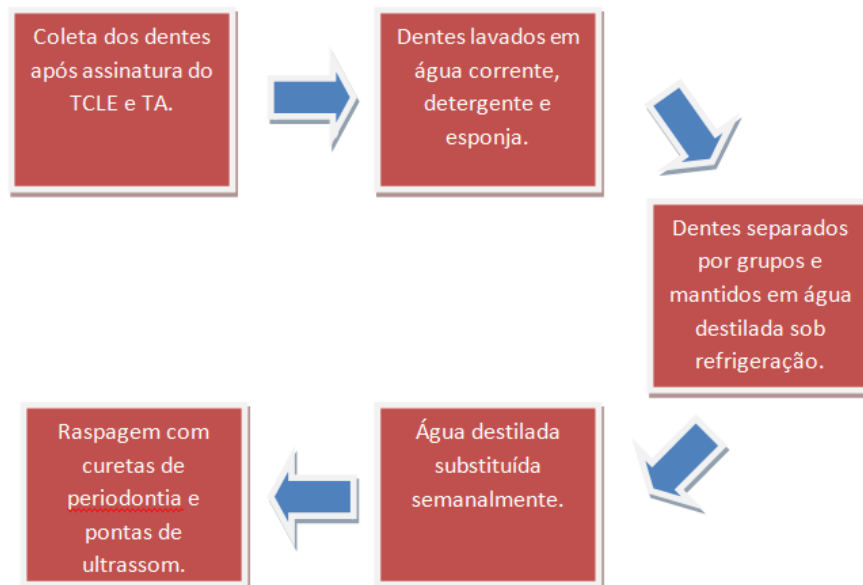


Figura 12. Protocolo para dentes extraídos.
Fonte: Adaptado de NASSIF et al., 2003.

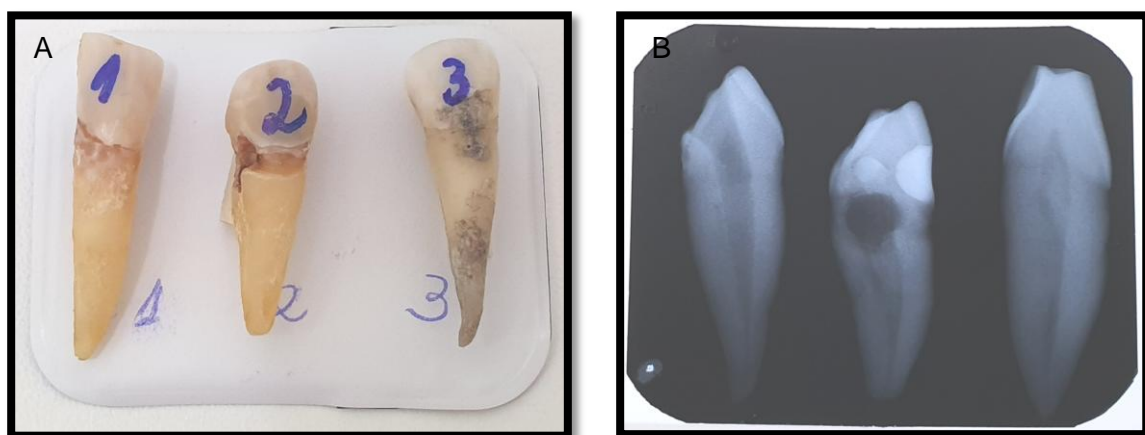


Figura 13. Dentes extraídos. (A) Unirradiculares. (B) Radiografia.
Fonte: Autor, 2019.

Concluída a seleção, foram executados os procedimentos para padronização do comprimento dos espécimes. Os dentes foram seccionados 2-3 mm abaixo da junção cimento esmalte e 3-5 mm do ápice de forma a se obter um

segmento intermediário da raiz com 8 mm de extensão. O corte das porções coronária e apical foi realizado por discos de carborundum (KG Sorensen Ind. Com. Ltda). Após este processo, as raízes foram armazenadas em frascos com solução fisiológica a 0,9%, a fim de permanecerem constantemente hidratadas até o início do experimento.

A padronização do diâmetro do canal radicular teve como objetivo alcançar, ao final da modelagem, um diâmetro do canal compatível ao apresentado pela broca Gates-Glidden #4 (Dentsply Ind. Com. Ltda). Para tanto, os canais foram progressivamente dilatados, valendo-se de limas Tipo K-file 1ª série (#15 a #40) de aço inoxidável (TDK file), limas de níquel-titânio recíprocantes X-file (TDK file) até o calibre #45 e brocas Gates-Glidden #2 e #3 (TDK file) para o preparo cervical. Para finalização do preparo, foi empregada a broca Gates-Glidden #4 (TDK file) em toda a extensão do canal radicular. Durante a preparação, soro fisiológico 0,9%, foi utilizado como irrigante a cada troca de instrumento. Os dentes foram mantidos em gazes umedecidas estéreis durante todo o procedimento para se evitar a desidratação.

Para eliminação da *smear layer* gerada durante os procedimentos de modelagem, todos os dentes foram imersos numa solução de EDTA 17% (Biodinâmica – Ibiporã, PR), seguido de NaOCl a 5,25% (Fórmula e Ação – Farmácia de Manipulação – São Paulo - SP), ambos por 4 minutos e, finalmente, em soro fisiológico pelo mesmo tempo (ATILA-PEKTAS, 2013).

Para a impermeabilização dos espécimes, foi aplicada uma camada de adesivo epóxi Araldite (BRASCOLA®) em toda a superfície radicular externa, exceto na porção correspondente ao acesso coronário e apical. Primeiramente foi iniciada a secagem das raízes com gaze e cone de papel absorvente. Depois, um cone de papel compatível ao diâmetro do canal foi inserido na sua luz de forma a ocupar este espaço durante todo o processo de impermeabilização, impedindo que o adesivo adentrasse ao canal (Figura 14). Após o período de secagem do impermeabilizante, os dentes foram estocados em solução fisiológica 0,9%.



Figura 14. Preparo dos espécimes. Os dentes para o estudo tiveram o seu comprimento padronizado por meio de marcações (A) e que após as secções ficaram com um intermediário de raiz de 8 mm de extensão (B e C). O diâmetro dos canais foi padronizado com a broca de Gates-Gliden #4 em toda a extensão do canal radicular (D e E). Para eliminação da *smear layer* os espécimes foram submetidos a banho ultrassônico em EDTA 17% e NaOCl a 5,25% (F, G e H) por 4 minutos. Os espécimes tiveram a superfície externa coberta com adesivo epóxi (I e J) e numerados (K).

Fonte: Autor, 2020.

3.8.2 Divisão, contaminação dos espécimes e aplicação das medicações intracanais

Para esterilização dos espécimes, os 120 dentes foram distribuídos de forma homogênea em grupos de cinco e foram colocados em tubos de vidro contendo 5 mL de solução fisiológica estéril (Figura 15). A esterilização foi realizada em autoclave (Phoenix[®]) por 20 minutos a 121 °C e 1 atm. Após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas em estufa (SOLAB[®]) a 37 °C para confirmação do processo de esterilização, que se caracteriza pela ausência de turbidez do meio (Figura 16) (GOMES et al., 2009).



Figura 15. Espécimes acondicionados em tubos de vidro.
Fonte: Autor, 2020.

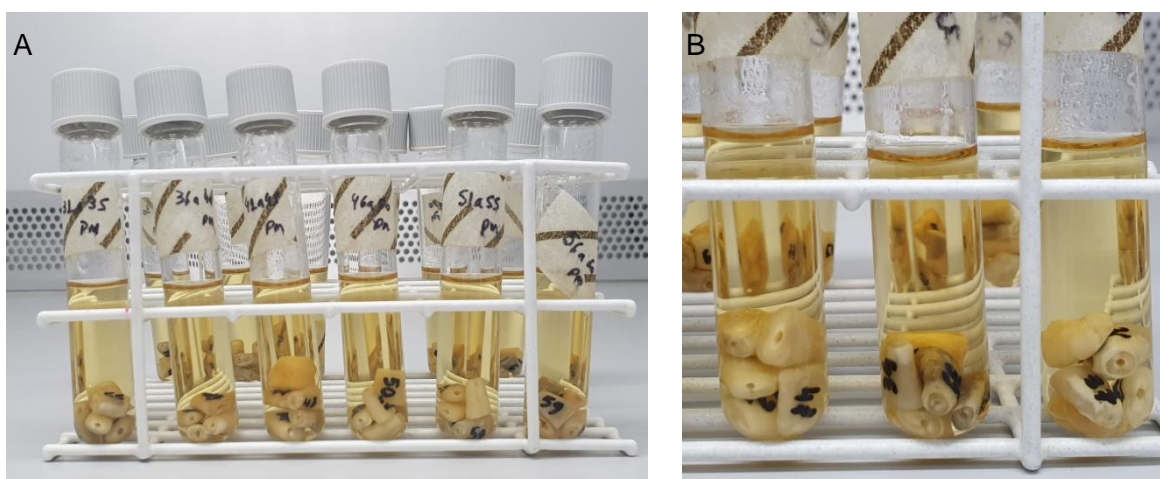


Figura 16. Espécimes após autoclavagem e incubados em estufa por 48 horas mostrando a ausência de turbidez do meio (A e B).
Fonte: Autor, 2020.

Para a contaminação dos espécimes foram utilizadas culturas puras de *Enterococcus faecalis* em caldo BHI e de *Candida albicans* em caldo Sabouraud Dextrose.

Enterococcus faecalis foi inicialmente cultivado em ágar BHI e incubado a 36 °C por 18 horas (*overnight*). Decorrido o tempo de incubação preparou-se o inóculo em caldo BHI, respeitando o padrão de concentração de 0,5 da escala McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), com absorbância de 600 nm em espectrofotômetro.

O preparo do inóculo de *Candida albicans* foi pelo isolamento de colônias previamente cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (SBD) por 24 horas em estufa a 36 °C (*overnight*). Foi ajustada à concentração ($1-5 \times 10^6$ ufc/mL) em caldo SBD, obtida com 75-77% de transmitância em espectrofotômetro.

Para a contaminação dos espécimes, os tubos, contendo o inóculo microbiano previamente preparado, foram agitados. Posteriormente, realizou-se a substituição dos 5 mL de solução fisiológica estéril, nos quais os espécimes tinham sido esterilizados, pelos 5 mL com as suspensões de micro-organismos. Cada espécie de micro-organismo contaminou 60 espécimes, totalizando os 120 selecionados. Posteriormente, os tubos foram vedados e incubados em estufa a 36 °C por 10 dias, para o *E. faecalis* e 14 dias para *C. albicans*. Renovações de 2 mL do meio de cultura contaminado por 2 mL de meio de cultura estéril foram realizadas a cada 2 dias para evitar a saturação do meio, em câmara de fluxo laminar. A avaliação de crescimento microbiano foi verificada pela presença de turbidez do meio (Figura 17 A e B).

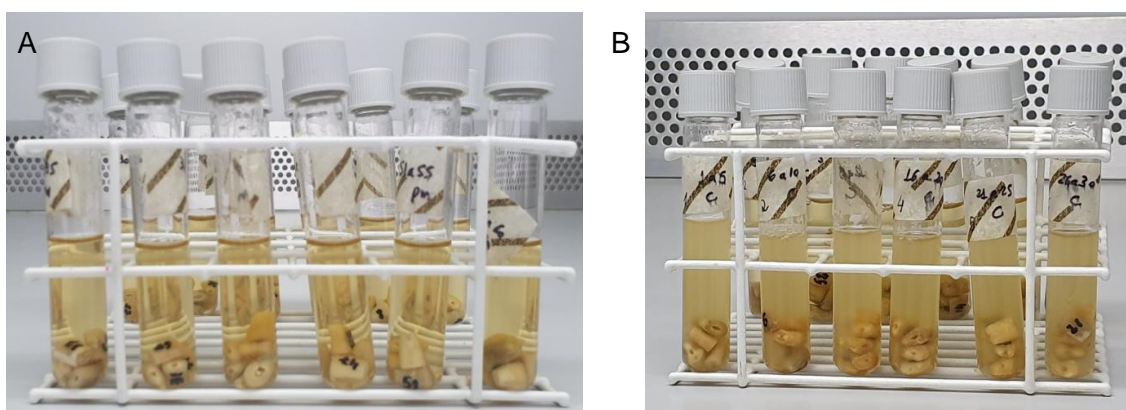


Figura 17. (A) Espécimes em caldo inoculado com os micro-organismos. (B) Turbidez do meio de cultura.

Fonte: Autor, 2020.

Os espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* foram divididos em 8 grupos (n=15) em função das substâncias antimicrobianas utilizadas posteriormente como medicação. A distribuição dos grupos está representada na Tabela 5.

Para este estudo foram selecionados: o hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica), propilenoglicol (Levviale), CHX gel 2% (Biodinâmica) e extrato etanólico da *Curcuma longa* associado ao hidróxido de cálcio e propilenoglicol (Figura 18). Para o preparo deste, foi utilizada a CIM nas combinações (100% de Ca(OH)₂ + 100% de extrato etanólico) e (75% de Ca(OH)₂ + 50% de extrato etanólico) para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente, determinados no FICl.

Tabela 5. Distribuição e agrupamento dos espécimes em função do micro-organismo e medicação avaliados.

Grupos	Substância química intracanal aplicada	Micro-organismo	Espécimes (n)
1	Propilenoglicol	<i>Enterococcus faecalis</i>	15
2	Hidróxido de cálcio + propilenoglicol	<i>Enterococcus faecalis</i>	15
3	Clorexidina gel 2%	<i>Enterococcus faecalis</i>	15
4	Hidróxido de cálcio + propilenoglicol + extrato etanólico da <i>Curcuma longa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	15
5	Propilenoglicol	<i>Candida albicans</i>	15
6	Hidróxido de cálcio + propilenoglicol	<i>Candida albicans</i>	15
7	Clorexidina gel 2%	<i>Candida albicans</i>	15
8	Hidróxido de cálcio + propilenoglicol + extrato etanólico da <i>Curcuma longa</i>	<i>Candida albicans</i>	15

Fonte: Autor, 2020.



Figura 18. Substâncias selecionadas como medicação intracanal. (A) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ P.A. (B) Clorexidina gel 2%. (C) $\text{Ca}(\text{OH})_2$, propilenoglicol e extrato de *C. longa*.
Fonte: Autor, 2020.

Com a utilização de uma pinça de Allis, para manipulação dos espécimes, primeiramente, foi realizada a limpeza do canal radicular com 5 mL de soro fisiológico 0,9% estéril. Após a irrigação, os dentes foram secos na superfície externa com gaze e interna com cones de papel absorvente (AllPrime[®]), ambos estéreis (Figura 19 A e B).

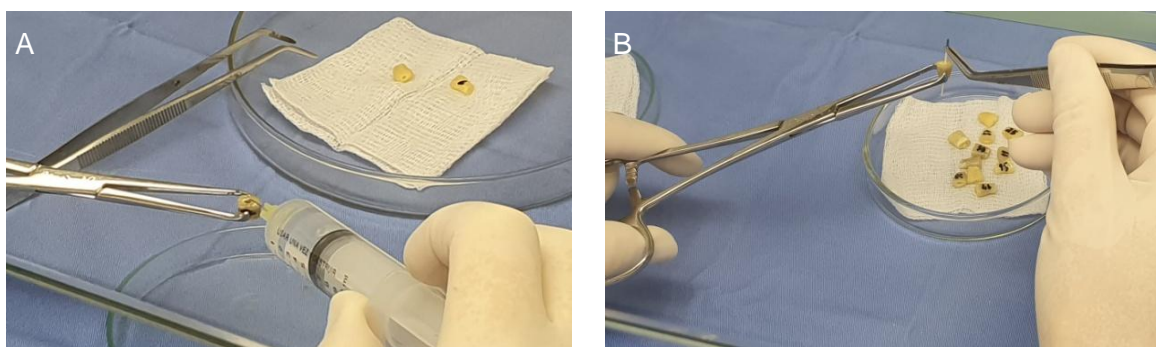


Figura 19. (A) Irrigação com solução fisiológica estéril. (B) Gaze e cone de papel estéril para a secagem dos canais.
Fonte: Autor, 2020.

As medicações foram aplicadas, após seu preparo, com seringas e agulhas compatíveis ao diâmetro do canal. Os medicamentos foram injetados no canal radicular até que houvesse o extravasamento da medicação na extremidade oposta da raiz. O excesso de material foi removido com gaze e ambos os acessos, coronário e apical, foram selados com cimento Cimpat (Septodont[®]). Posteriormente, os espécimes foram acomodados no interior de placas de 24 poços, protegidos com algodão estéril e hidratados com soro fisiológico, também estéril. As placas vedadas, foram identificadas e incubadas a 36 °C por 7 dias para avaliação da ação antimicrobiana, sempre mantidos hidratados (Figura 20).

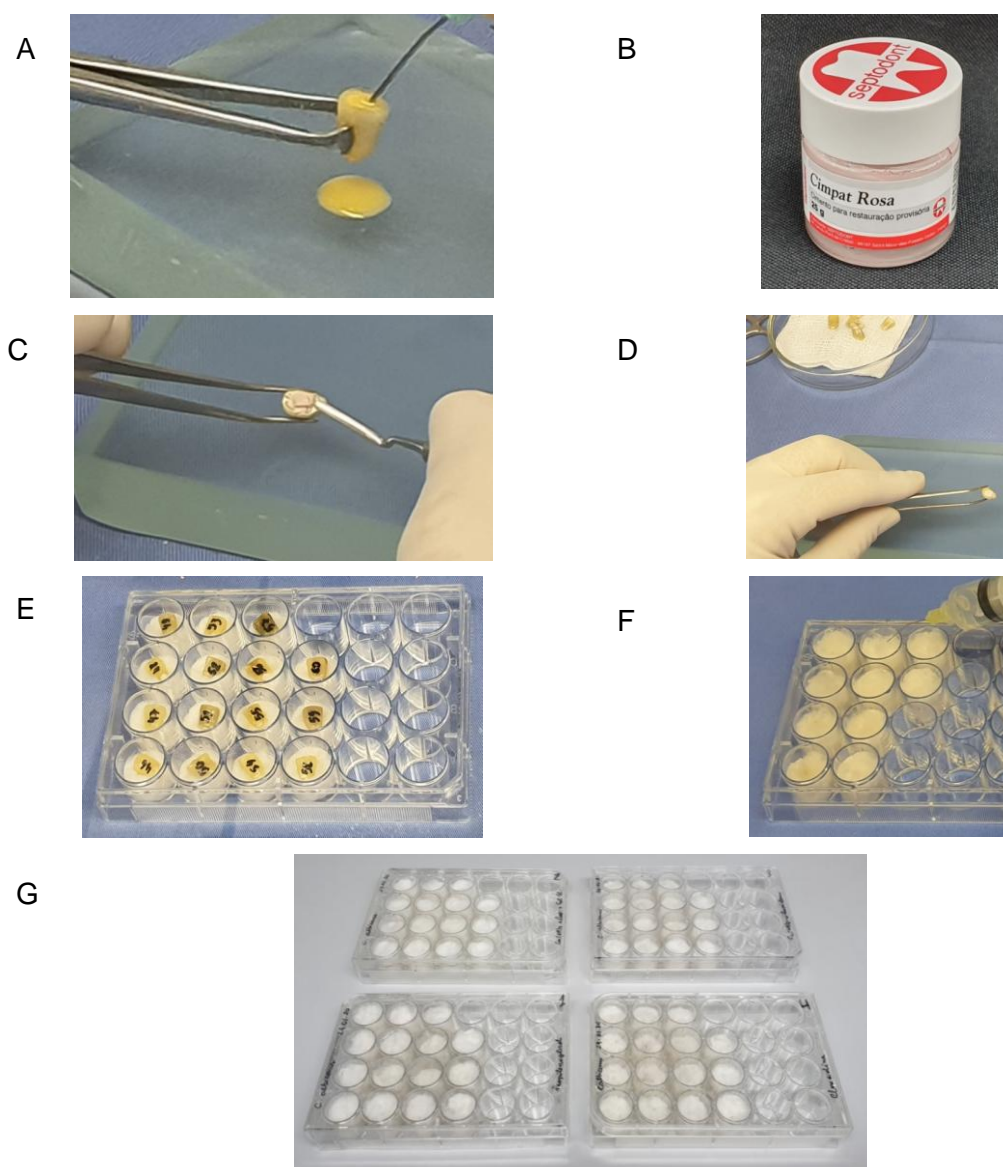


Figura 20. Aplicação das medicações. (A) Extravasamento da medicação. (B) Cimento restaurador provisório. (C e D) Cimento restaurador aplicado no espécime. (E) Espécimes alojados em placas de 24 poços. (F) Hidratação com solução fisiológica estéril. (G) Placas separadas por grupos de medicações.
 Fonte: Autor, 2020.

3.8.3 Coleta das amostras

Ao concluir o período de sete dias de contato com as substâncias antimicrobianas, os espécimes foram removidos da estufa e então se realizou a coleta das amostras em câmara de fluxo laminar. Campo cirúrgico e luvas estéreis foram utilizados para manter o ambiente livre de contaminação externa. Os espécimes foram apreendidos com pinça Allis e o cimento restaurador

provisório foi removido, em ambas às extremidades. Posteriormente, a medicação intracanal foi removida com 5 mL de solução fisiológica 0,9% estéril. Foi realizada também irrigação com 1 mL de neutralizador específico (SIQUEIRA et al., 1998) para cada uma das substâncias testadas, a fim de se evitar a ação residual das medicações intracanaís (Tabela 6). Por fim, utilizou-se 1 mL de solução fisiológica 0,9% estéril como irrigação final; o canal e a superfície externa das raízes foram secados novamente (Figura 21).

Tabela 6. Substâncias neutralizadoras recomendadas em função das medicações intracanaís avaliadas.

Medicação	Neutralizador
Propilenoglicol	Solução fisiológica 0,9% estéril
Hidróxido de cálcio	Ácido cítrico (0,5%)
Clorexidina gel 2%	Tween 80 (0,5%) + Lecitina de soja (0,07%)
Hidróxido de cálcio + Extrato etanólico da <i>Curcuma longa</i>	Tween 80 (0,5%) + Lecitina de soja (0,07%)

Fonte: Adaptado de SIQUEIRA et al., 1998.

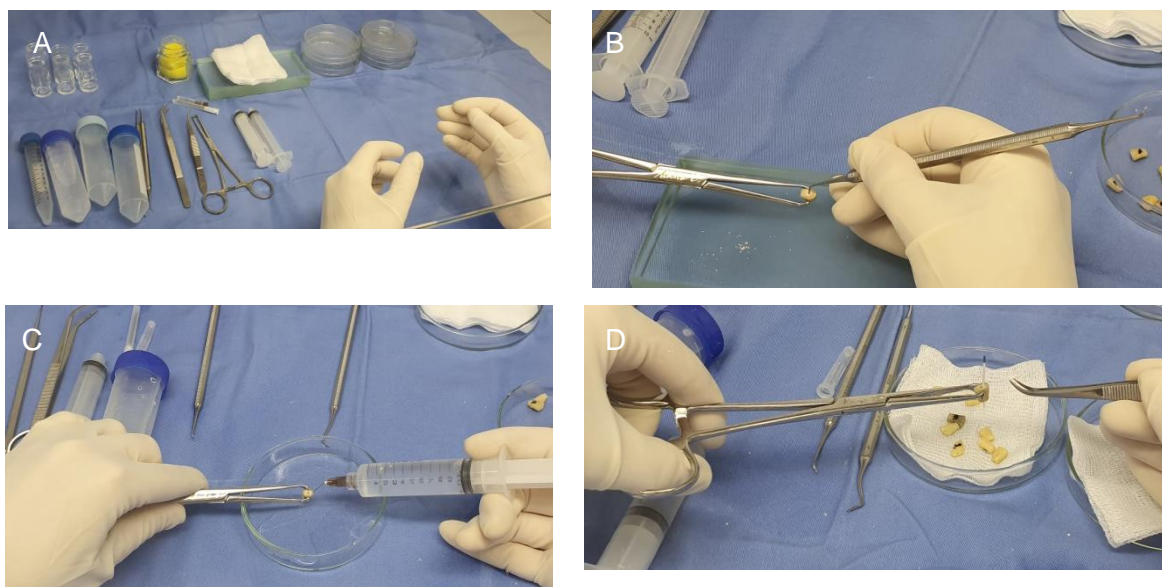


Figura 21. Aplicação das medicações. (A) Ambiente estéril. (B) Remoção do cimento restaurador provisório. (C) Irrigação com solução fisiológica estéril. (D) Secagem com cones de papel estéril.

Fonte: Autor, 2020.

Para a coleta das amostras, foram utilizadas brocas tipo Gates-Glidden #5 e #6 (TDK file), que, quando acionadas por motor elétrico (X-Smart Plus - Dentsply) com 500 rpm e torque de 1N, promoverão o corte da dentina numa extensão de 0-100 μm e de 100-200 μm , respectivamente. Portanto, as amostras obtidas eram constituídas em raspas de dentina advindas do processo de ampliação padronizada do diâmetro do canal radicular. Para o recolhimento das amostras, os espécimes apreendidos em pinça Allis foram posicionados sobre a abertura de microtubos com 1 mL de solução fisiológica 0,9% estéril. A broca de Gates-Glidden foi ativada penetrando em toda a extensão do canal até que sua parte ativa ultrapassasse a extremidade oposta da raiz. Esta manobra foi realizada 2 vezes em cada espécime criando um espaço compatível ao diâmetro da broca (Gates Glidden #5 e #6). Portanto, para cada um dos espécimes foram obtidas 2 amostras de raspas de dentina correspondentes as profundidades sequenciais da dentina radicular (Figura 22).

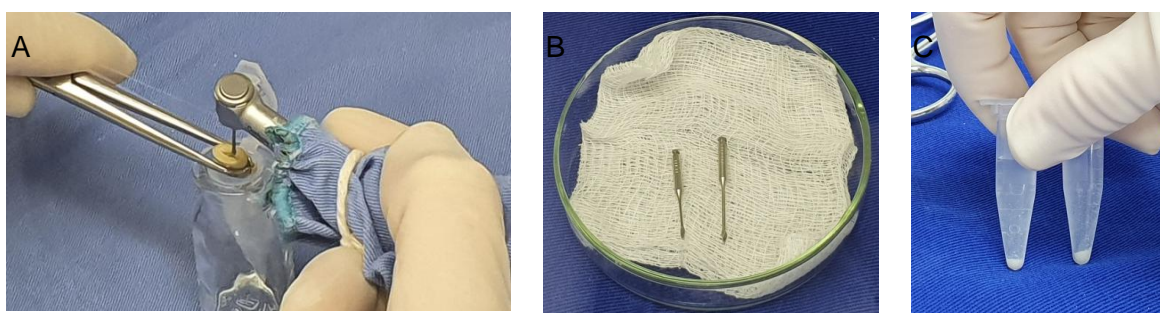


Figura 22. Coleta das amostras. (A) Brocas de Gates Glidden acionadas a motor. (B) – Gates Glidden #5 e #6. (C) Raspas de dentina.
Fonte: Autor, 2020.

3.8.4 Processamento das amostras para cultura microbiológica

Imediatamente após a coleta, as amostras foram agitadas mecanicamente por 1 minuto em vortex.

Após a homogeneização foram utilizadas alças calibradas de 10 μL para o grupo controle e (10, 50 ou 100 μL), para os grupos de tratamento. Assim, a suspensão presente nos microtubos foi plaqueada em triplicata em placas de Petri contendo ágar BHI para amostras contaminadas com *E. faecalis* e ágar SBD para aquelas com *C. albicans*.

As placas foram incubadas em estufa a 36 °C durante 18/24 horas em condições de aerobiose. Decorrido o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias de micro-organismos, com auxílio de Contador de Colônias CP 600, para determinar o número de UFC/mL (Figura 23).

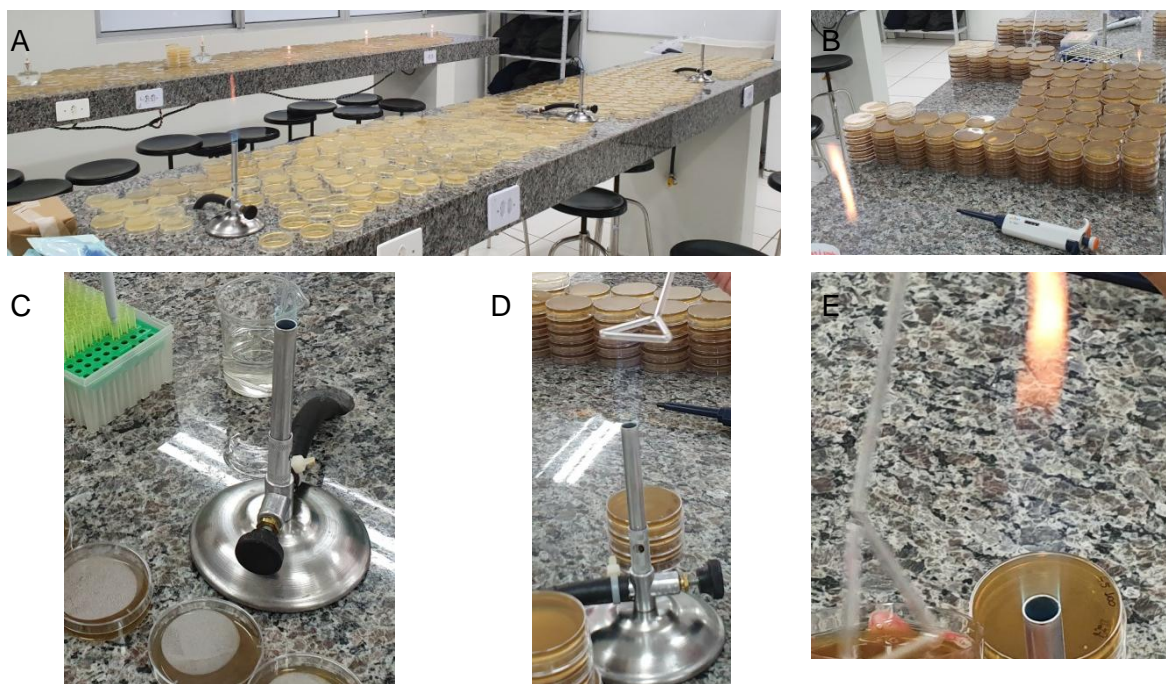


Figura 23. Plaqueamento das amostras. (A) Placas ágar BHI. (B) Placas de ágar SBD. (C) Micropipetadora. (D e E) Alça de Drigalski.
Fonte: Autor, 2020.

3.9 Análise Estatística

As descrições dos dados foram realizadas por meio de tabelas de frequências (absolutas e relativas), média e desvios-padrão.

As variáveis numéricas foram avaliadas quanto à distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, sendo o pressuposto de normalidade aceito, foram apresentadas em média (\bar{x}) e desvio padrão (DP). Caso apresentassem dados não normais os testes de comparações para dois grupos foram utilizados o teste U Mann-Whitney e para os quatro grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e seus dados representados por mediana e seus quartis (25-75%). Todas as análises foram realizadas, por meio do programa SPSS 22.0 (IBM SPSS®, Armonk, NY, USA) e o nível de significância foi estipulado em 5% ($P \leq 0,05$).

4. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B., HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, p. 40-59, 2009.

AAE. **Guide to Clinical Endodontics**. Sixth Edition, 2013. Disponível em: <https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/guide-clinicalendodontics/> Acesso em: 02 de abr. 2020.

ATILA-PEKTAŞ, B.; YURDAKUL, P.; GÜLMEZ, D.; GÖRDUYSUS, Ö. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 5, p. 413-418, 2013.

BAGHAEIAN, P. et al. Effect of addition of curcumin nanoparticles on antimicrobial property and shear bond strength of orthodontic composite to bovine enamel. **Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 373-382, 2016.

BRASIL; CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. Resolução CFO-82. **Regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal**. Rio de Janeiro-RJ, 2008. Disponível em: <http://sistemas.cfo.org.br/visualizar/atos/RESOLU%C3%87%C3%83O/SEC/2008/82/> Acesso: 04 de abr. 2020.

BYSTRÖM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endodontics and dental traumatology**, v. 1, n. 5, p. 170–175, 1985.

CABRAL, C. T.; FERNANDES, M. H.. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. **Clinical oral investigations**, v. 11, n. 2, p. 155-164, 2007.

CARVALHO, C. N. et al. Ions release and pH of calcium hydroxide, chlorhexidine and bioactive glass-based endodontic medicaments. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 3, p. 325-331, 2006.

CHAI, W. L., HAMIMAH, H., CHENG, S. C., SALLAM, A. A., ABDULLAH, M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. **Journal of oral science**, v. 49, n. 2, p. 161-166, 2007.

CHANG, Y. C., CHOU, M. Y. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 91, n. 2, p. 230-234, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. M27-A2. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**: Norma Aprovada – 2ª Edição. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, v. 22, n. 15, p. 1-44, 2002. 52

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**: ninth edition. Wayne, PA: CLSI, v. 32, n. 2, p. 1-68, 2012.

CUSTÓDIO, H. N. **Estudo do processo de extração das frações volátil e fixa de oleorresina de cúrcuma**. 2014. 48f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2014.

DEVARAJ, S.; JAGANNATHAN, N.; NEELAKANTAN, P. Eficácia antibiofilme de curcumina fotoativada, pasta antibiótica tripla e dupla, clorexidina a 2% e

hidróxido de cálcio contra *Enterococcus faecalis in vitro*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24797, 2016.

ELAVARASU, S. et al. Evaluation of superoxide dismutase levels in local drug delivery system containing 0.2% curcumin strip as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis: a clinical and biochemical study. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 48-52, 2016.

EVANS, M. D.; BAUMGARTNER, J. C.; KHEMALEELAKUL, S. U.; XIA, T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J Endod**, v. 29, n. 5, p. 338-39, 2003.

FARIA, G.; CARDOSO, C. R.; LARSON, R. E.; SILVA, J. S.; ROSSI, M. A. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 234, n. 2, p. 256-265, 2009.

FERREIRA, M. R. A. et al. Antifungal activity of medicinal plants from North eastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 3008-3013, 2013.

FERREIRA, N. S. et al. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v.41, p. 824-830, 2015.

GIANNELLI, M.; CHELLINI, F.; MARGHERI, M.; TONELLI, P.; TANI, A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 2, p. 308-317, 2008.

GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. Curcumin the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 7, p. 919-930, 2010.

GOMES, A. S. G.; CURVELO J. A. R.; SOARES R. M. A.; PEREIRA A.F. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. **Medical Mycology**. v. 50, n. 1, p. 26-32, 2012.

GOMES, B. P. F. A. et al. Chlorhexidine in Endodontics. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 2, p. 89-102, 2013.

GOMES, B. P.; MONTAGNER, F.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; DE ALMEIDA, J. F. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. **Journal of dentistry**, v. 37, n. 1, p. 76-81, 2009.

HAAPASALO, M.; UDNAES, T.; ENDAL, U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 29-56, 2003.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**. v. 15, p. 639–652, 2008.

LEE, T. H.; HU, C. C.; LEE, S. S.; CHOU, M. Y.; CHANG, Y. C. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 5, p. 430-435, 2010.

LIMA, R. K. P.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; FARIA-JÚNIOR, N. B.; TANOMARU-FILHO, M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 4, p. 311-316, 2012.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. Elsevier: Brasil, 2015.

MAJOLO, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

MARTINS, C. V. B. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 337–339, 2008.

MENEZES, M. M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganism within the root canals. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 311-319, 2004.

MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P.M.H. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 8, p. 697-730, 2011.

MOREIRA, M. S.; ANUAR, A. S. N. S.; TEDESCO, T. K.; DOS SANTOS, M.; MORIMOTO, S. Endodontic treatment in single and multiple visits: an overview of systematic reviews. **Journal of endodontics**, v.43, n. 6, p. 864-870, 2017.

MURAD, C. F. et al. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 7, p. 899-906, 2014.

NAIR, P. R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K. E.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **Journal of endodontics**, v. 16, n. 12, p. 580-588, 1990.

NAIR, P. N. R. et al. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. **International Endodontic Journal**, v. 26, n. 4, p. 225-233, 1993.

NASSIF, A. C. D. S.; TIERI, F.; ANA, P. A. D.; BOTTA, S. B.; IMPARATO, J. C. P. Estruturação de um banco de dentes humanos. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, p. 70-74, 2003.

NEELAKANTAN, P. et al. Biofilms in endodontics - current status and future directions. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, p. 1748, 2017.

NEELAKANTAN, P. et al. Effectiveness of curcumin against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 6, p. 1453-1457, 2013.

PAVELIĆ, B. et al. The antimicrobial efficiency of aqueous solutions of calcium hydroxide on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* and *Candida albicans*, *in vitro*. **Acta stomatologica Croatica**, v. 25, p. 207-212, 1991.

PEREIRA, T. C.; VASCONCELOS, L. R. D. S. M.; GRAEFF, M. S. Z.; RIBEIRO, M. C. M.; DUARTE, M. A. H.; DE ANDRADE, F. B. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. **Clinical oral investigations**, v. 23, n. 3, p. 1253-1262, 2019.

PETERS, O. A. et al. Changes in root canal geometry after preparation assessed by highresolution computed tomography. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2001.

PRABHAKAR, A. R. et al. Comparison of Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide Paste, 2% Chlorhexidine Gel and Tumeric Extract as an Intracanal Medicament and their Effect on Microhardness of Root Dentin: An *in vitro* Study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 6, n. 3, p. 171-177, 2013.

PUCHER, J. J.; DANIEL, C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro*. **Journal of periodontology**, v. 63, n. 6, p. 526-532, 1992.

REZENDE, G. C. et al. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2016.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1171-1175, 2011.

SAATCHI, M.; SHOKRANEH, A.; NAVAEI, H.; MARACY, M. R.; SHOJAEI, H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 5, p. 356-365, 2014.

SAHA, S.; NAIR, R.; ASRANI, H. Comparative Evaluation of Propolis, Metronidazole with Chlorhexidine, Calcium Hydroxide and *Curcuma Longa* Extract as Intracanal Medicament Against *E.faecalis* - An Invitro Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 11, p. 19-21, 2015.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.

SATHORN, C.; PARASHOS, P.; MESSER, H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. **Int Endod J**, v. 40, n. 1, p. 2-10, 2007.

SATHORN, C.; PARASHOS, P.; MESSER, H. Effectiveness of single-versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 6, p. 347-355, 2005.

SHUPING, G. B. et al. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p.751-755, 2000.

SILVA, L. V. et al. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. **Food Research International**, v. 38, p. 1087-1096, 2005.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Aetiology of root canal treatment failure: why well treated teeth can fail. **International Endodontic Journal**, v. 14, n. 2, p. 109-113, 2003.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. et al. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 216, n. 6, p. 305-312, 2014.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; LOPES, H. P.; UZEDA, M. Atividade antibacteriana de medicamentos endodônticos sobre bactérias anaeróbias estritas. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 50, p. 326-332, 1996.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; LOPES, H. P.; UZEDA, M. Avaliação da atividade antibacteriana de medicação intracanal. Três bases fortes e pastas à base de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 44, p. 271-274, 1996.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; DA SILVA, C. P.; CERQUEIRA, M. D. D.; LOPES, H. P.; DE UZEDA, M. Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones. **Dental Traumatology**, v. 14, n. 3, p. 124-126, 1998

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301, 2008.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2009.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 969-981, 2008.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 97, n. 1, p. 85-91, 2004.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Present status and future directions in endodontic microbiology. **Endodontic Topics**, v. 30, n. 1, p. 3-22, 2014.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P.; MAGALHÃES, F. A.; DE UZEDA, M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **J Endod**, v. 29, n. 8, p. 501-504, 2003.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; MAGALHÃES, F. A.; DE UZEDA, M. Antifungal effects of endodontic medicaments. **Australian Endodontic Journal**, v. 27, n. 3, p. 112-114, 2001.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; SPÅNGBERG, L. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **International Endodontic Journal**, v. 24, p. 119-125, 1991.

SOARES, J. A. et al. Elimination of intracanal infection in dogs' teeth with induced periapical lesions after rotatory instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes. **Journal of Applied Oral Science**, v. 14, n. 3, p. 172-177, 2006.

SOUZA-FILHO, F. J. D.; SOARES, A. D. J.; VIANNA, M. E.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. D. A. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Brazilian dental journal**, v. 19, n. 1, p. 28-33, 2008.

SUBBIAH, U.; ELANGO, S.; JAYESH, R. Chapter 25 – Herbas and Green synthesized nanoparticles in dentistry. **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry**. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815886-9.00025-5>. p. 617-646, 2019.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 85, p. 86-93, 1998.

VASUDEVA, A.; SINHA, D. J.; TYAGI, S. P.; SINGH, N. N.; GARG, P.; UPADHYAY, D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. **Singapore dental journal**, v. 38, p. 39-44, 2017.

VINOTHKUMAR, T. S. et al. *In vitro* evaluation of five different herbal extracts as an antimicrobial endodontic irrigant using real time quantitative polymerase chain reaction. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 16, n. 2, p. 167-170, 2013.

WAGHMARE, P. F.; CHAUDHARI, A. U.; KARHADKAR, V. M.; JAMKHANDE, A.S. Comparative evaluation of turmeric and chlorhexidinegluconate mouthwash in prevention of plaque formation and gingivitis: a clinical and microbiological study. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 12, n. 4, p. 221-224, 2011.

WALTIMO, T. M.; ØRSTAVIK, D.; SIREN, E. K. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 421-429, 1999.

WALTIMO, T. M.; SIREN, E. K.; ØRSTAVIK, D. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 94-98, 1999.

ZAMBRANO, L. M. G. et al. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

5. Evaluation of the association of calcium hydroxide and *Curcuma longa* extract as an endodontic medication

Sandriane Moreno^{1,2*}, Lucas Antunes Marmith², Caroline Giane De Carli¹, Carolina Panis¹, Kérley Braga Pereira Bento Casaril¹, Conceição de Fátima Alves Olguin³, Emyr Stringhini Júnior², Cleide Viviane Buzanello Martins^{3*}

¹ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, PR, Brazil.

² Centro Universitário UNISEP, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.

³ Centro de Engenharias e Ciência Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR, Brazil.

*Corresponding authors: Sandriane Moreno (Tel.: +55-46-99974-0972; E-mail: sandriane.fb@gmail.com) and Cleide Viviane Buzanello Martins (Tel.: +55-31-98717-9581; E-mail: cvbmartins@gmail.com)

Abstract: The purpose of this study was to evaluate *in vitro* and *ex vivo* the antimicrobial efficacy of the extract of *Curcuma longa* on *Candida albicans*. After, the rhizome ethanolic extract was obtained. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined, using the broth microdilution test. Hemolysis profile was performed to check the toxicity of the substances. Roots, from extracted single-rooted human teeth, (n=28) were standardized and their channels prepared with manual and automated instrumentation. These specimens were inoculated with *Candida albicans* for 14 days. After this period, they were randomly allocated to four treatment groups: propylene glycol (Group I, n=7), calcium hydroxide (Group II, n=7), 2% chlorhexidine gel (Group III, n=7) and Ca(OH)₂ with ethanolic extract of *C. longa* (Group IV, n=7). After medication, the specimens were incubated for 7 days. Sample collection was performed with Gates Glidden drills, at two levels of dentin depth, and allowed the counting of colony forming units (cfu/mL). The data were analyzed using the Kruskal-Wallis statistical test with the significance level set at 5% (P≤0.05). The results showed that in the most superficial region, Group III was more effective than the others, with a statistically significant difference. In the deepest portion, there was a statistically significant difference for Groups III

and IV ($P=0.01$) when compared to the control group. Thus, the ethanolic extract associated with Ca(OH)_2 has antimicrobial activity against *C. albicans* and improved its action on the innermost portion of dentin.

Descriptors: Endodontics; Curcuma; Candida albicans.

Introduction

For centuries, herbal medicines have been used to prevent and control dental diseases, as well as providing new alternatives to microbial resistance to antibiotics and opportunistic diseases.¹

Curcumin has been recognized worldwide as a “miracle drug of the future”.² Studies have proven its activity against several species of fungi including *Candida albicans*.^{3,4} *Curcuma longa* is used in the treatment of various diseases, due to its anti-inflammatory, antioxidant, anticarcinogenic, antimicrobial potential.⁵

Yeasts were found in root canals of filled teeth in which endodontic treatment failed. This suggests that these microorganisms may be resistant to endodontic therapy.^{6,7,8} In fact, *Candida* spp. are resistant to some drugs commonly used in endodontics.⁹

The microbiota associated with persistent infection is usually composed of a single species or fewer species, when compared to the primary infection. It has a predominance of gram-positive anaerobic bacteria and among fungal infections, those caused by *C. albicans*.¹⁰

Numerous measures to reduce the number of microorganisms in the root canal system have been introduced in endodontic therapy, including various instrumentation techniques with mechanical systems, irrigation regimes and intrachannel medications.¹¹ However, effective disinfection during endodontic therapy is still a complicated and challenging issue.¹²

Calcium hydroxide (Ca(OH)_2) is a substance widely used to reduce the remaining microorganisms and their metabolites from infected root canals, and thereby speed up the healing process¹³. However, it can demonstrate better performance when combined with other substances, improving its antifungal action.¹⁴ Its mechanism of action is the result of the dissociation of hydroxyl and calcium ions, with a consequent increase in pH, which gives it antimicrobial and

mineralization-inducing action, with the possibility of repairing adjacent periapical tissues.¹⁵

The antibacterial efficacy of Ca(OH)₂ as an intracanal dressing was evaluated by culture techniques. It was found that it has limited effectiveness in eliminating microorganisms from human root canals.¹⁶

Chlorhexidine (CHX) has been used in endodontics as an irrigating substance or intracanal medication. However, some studies have demonstrated a possible cytotoxic effect. It has a toxic effect both *in vivo* and *in vitro*. The intrinsic mechanism underlying cytotoxicity induced in eukaryotic cells is still unknown. It has been suggested that chlorhexidine may induce the death of L929 fibroblasts cultured through the stress of the endoplasmic reticulum.¹⁷

The *in vitro* cytotoxicity of CHX was investigated in cells that could represent common targets for its action, such as surgical procedures for periodontitis or peri-implantitis, and to elucidate its mechanisms of action. The osteoblastic, endothelial and fibroblast cell lines were exposed to various concentrations of CHX for different times and tested for cell viability and cell death. CHX affected cell viability in a dose and time dependent manner, mainly in osteoblasts. These data suggest that CHX is highly cytotoxic *in vitro* and more caution is needed in its use in oral surgical procedures.¹⁸

In the absence of scientific evidence of the best irrigation solution or intracanal medication, the possible side effects of CHX, as well as the ineffectiveness of Ca(OH)₂ on certain microorganisms, the continuous search for new substances with antimicrobial effect is necessary. The aim of this study was to compare the *in vitro* efficacy of the extract of *C. longa* associated with calcium hydroxide as an intracanal medication against *C. albicans*.

Methodology

Obtaining essential oil and extracts from *Curcuma longa*

Rhizomes of *C. longa* went through a hydrodistillation process and the Essential Oil (EE) was extracted. The dry residues were subjected to solid-liquid extraction with ethanol. The extract was concentrated on a rotary evaporator (Fisatom®), obtaining EE.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

To determine the MIC of the substances: EE and OE of *C. longa*, as well as that of Ca(OH)_2 , the broth microdilution test was performed. The test concentrations were in the following ranges: OE and Ca(OH)_2 (1024 to 8 $\mu\text{g/mL}$) and EE (256 to 2 $\mu\text{g/mL}$). Serial dilution, at twice the test concentration, was performed in 96-well plates. The microorganism used to prepare the inoculum ($0.5\text{-}5 \times 10^3$ cfu/ mL)¹⁹ was *C. albicans* ATCC 18804. The plate with the substances was inoculated and incubated in an oven at 35 °C. After 24 hours, a visual reading was performed, with the analysis of the concentrations of the substances. MIC was considered to be one where there was no visual growth or where there was a 50-80% inhibition of microbial growth when compared to growth control. Based on the MIC of Ca(OH)_2 and EE of *C. longa*, combinations in percentage (100% to 6.25%) of these substances were prepared. Different combinations were distributed in a 96-well plate and in duplicate. Then the yeast inoculum ($0.5\text{-}5 \times 10^3$ cfu/mL) was added.¹⁹ The reading was performed after incubation at 35°C/24 hours, where visual inhibition of growth was observed inhibited yeast growth.

Extract toxicity test - hemolysis profile

Hemolysis tests were performed on the substances based on MIC and CFM (minimum fungicidal concentration) obtained in in vitro tests. Ca(OH)_2 :128 $\mu\text{g/mL}$, EE:64 $\mu\text{g/mL}$ and OE:512 $\mu\text{g/mL}$ for *C. longa*, 2% liquid CHX and solvents were also used: (methanol: DMSO/980:20 μL). From an EDTA tube of whole blood, centrifugation was performed at 4000 rpm for 5 min at room temperature. After removing the plasma, the red blood cells were washed and diluted 1:100 in saline. In microtubes, the batteries of the tests were performed, in order to obtain the final concentrations of 10x, 1x and 0.1x for each extract and solvent of interest. The final volume was 500 μL , obtained by adding the volume of each substance diluted in saline. After incubation at room temperature for 20 min, the batteries were centrifuged at 4000 rpm for 5 min and the supernatant read in a spectrophotometer at 540 nm against a blank tube containing saline.

Preparation of teeth

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University of Western Paraná, UNIOESTE (protocol #3.362.737). Twenty-eight extracted, uniradicular and single-channel human teeth were collected and stored in physiological solution. They went through a selection, storage and preparation protocol. The teeth were sectioned, with diamond disc (KG Sorensen), 2-3 mm below the enamel cementum junction and 3-5 mm from the apex in order to obtain an intermediate root segment with 8 mm in length. The channels were progressively dilated with Gates-Glidden(GG) #2 and #3 (TDK file) drills for cervical preparation, first series manual files (TDK file) and X-file reciprocating nickel-titanium files (TDK file) up to caliber #45, with X-Smart Plus engine (Dentsply Sirona). To finish the preparation, a drill GG#4 (TDK file) was used in the entire length of the root canal to standardize its diameter. During instrumentation, 0.9% saline was used as an irrigant for each instrument change. After the root canal instrumentation was completed, the teeth were immersed, with the following substances, in an ultrasonic vat. First in 17% ethylenediamino tetraacetic acid (EDTA), then in 5.25% NaOCl, both for 4 min to eliminate the smear layer, generated during the modeling procedures. Finally, immersed in 0.9% saline solution.²⁰ For waterproofing the specimens, a layer of Araldite epoxy adhesive (BRASCOLA®) was applied to the entire external root surface, except in the portion of the coronary and apical access. Seven specimens were placed in test tubes containing saline and autoclaved for 20 min at 121 °C.

Inoculation

All microbiological experiments were conducted under aseptic conditions in a flow hood. *C. albicans* (ATCC 18804) was grown on sabouraud dextrose agar (SBDA) overnight. A fungal suspension was adjusted to $(1-5 \times 10^6 \text{ cfu/mL})$ in SBD broth. The saline solution was removed from the tubes, containing the specimens, using micropipettes and 5 mL of inoculated broth was added. The tubes were closed and incubated at 35 °C for 14 days. Contaminated broth was replaced every 2 days with sterile broth.

Medication

At the end of the inoculation period, the specimens were removed from the tubes, in a sterile environment, washed with 0.9% saline solution, dried with gauze and paper cones, all sterile. The groups, each with 7 samples of teeth, were medicated with the following substances: Group I(GI) (negative control): propylene glycol (Levviale); Group II(GII): Ca(OH)_2 (Biodinâmica®) with propylene glycol; Group III(GIII): CHX gel 2% (Biodinâmica®); and Group IV(GIV): Ca(OH)_2 , propylene glycol and EE of *C. longa*. For the preparation of this mixture, the concentration (MIC) obtained in the combination test of the substances (75% for Ca(OH)_2 and 50% for EE) was used. After the application of the substances, excess material was removed with gauze and both accessions, coronary and apical, were sealed with Cimpat cement (Septodont®). The specimens were accommodated in plates, for 24-well cell culture, containing cotton wool moistened with sterile 0.9% saline and incubated for 7 days at 35 °C. For the preparation of the GIV medication, MIC was used, verified in the in vitro tests. All medications were placed with needles compatible with the diameter of the root canal.

Measurement of fungal burden

The specimens were transferred from the 24-well plates to a sterile environment. Intrachannel medications were removed with 1 mL of specific neutralizer before collection for microbial sampling, with the following protocol: for the removal of propylene glycol, the channels were irrigated with sterile saline. For GIII, a mixture of 0.5% Tween 80 and 0.07% soy lecithin was used; GII, 0.5% citric acid, GIV, 0.5% citric acid and the mixture of 0.5% Tween 80 with 0.07% soy lecithin. Afterwards, all groups were irrigated with 1 mL of sterile 0.9% saline. The specimens were dried externally with gauze and internally with a sterile paper cone. The collection of microbial samples was performed using GG#5 and #6 drills (TDK file), driven by an electric motor (X-Smart Plus-Dentsply Sirona) with 500 rpm and 1N torque, which promote dentine cutting in a 0-100 μm and 100-200 μm , respectively, in the same specimen. The dentin shavings were placed in microtubes with saline solution. Immediately after collection, the samples were agitated for 1 minute in a vortex. After homogenization, they were sown in triplicate in Petri dishes (60x15mm) containing SBD agar. The plates were incubated in an

oven at 35 °C/24h under aerobic conditions. Cultured colonies were counted and interpreted as colony forming units per milliliter (cfu/mL).

Statistical analysis

Data descriptions were performed using frequency tables (absolute and relative), mean and standard deviations. The numerical variables were assessed for the distribution of normality by the Shapiro-Wilk test and, with the assumption of normality being accepted, they were presented as mean (\bar{x}) and standard deviation (SD). If they presented non-normal data, the comparison tests for two groups were used using the Mann-Whitney U test and for the four groups, the Kruskal-Wallis test and its data represented by median and its quartiles (25-75%). All analyzes were performed using the SPSS 22.0 program (IBM SPSS®, Armonk, NY, USA) and the level of significance was set at 5% ($p \leq 0.05$).

Results

Through the broth microdilution test, performed with the substances: OE and EE from *C. longa* and Ca(OH)_2 , the following results were obtained, respectively: 512, 32 and 128 μL . These values determined the MIC for each of the substances.

For the test of the combination between the substances, using the MIC of Ca(OH)_2 and EE, it was verified that there was no growth of the microorganism in the combination 75% of Ca(OH)_2 with 50% of EE. Thus, the concentrations (96 μL and 16 μL) were determined for Ca(OH)_2 and EE, respectively.

In the hemolysis test, according to the results found, it was observed that the substances showed different behaviors. CHX, in concentration (1x), was the one with the most hemolysis, followed by Ca(OH)_2 , OE and finally EE. The solvent was tested at (10x) the concentration used and demonstrated the lowest rate of hemolysis compared to the other substances (Figure 1).

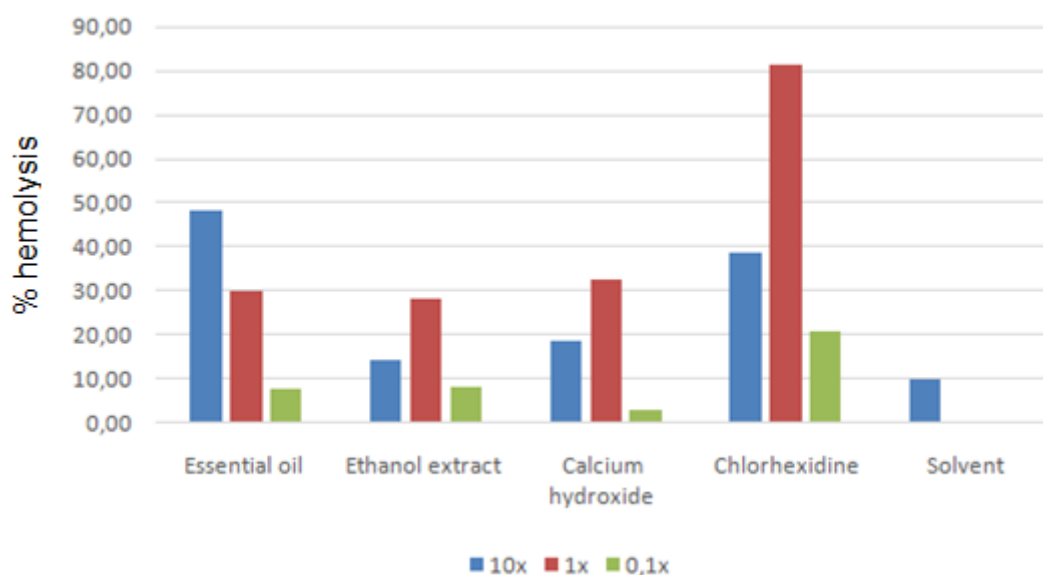


Figure 1. Hemolysis profile of the tested substances. Substances evaluated in the toxicity test and the percentage of hemolysis at different concentrations.

In the *ex vivo* test, the antimicrobial efficacy of groups II, III and IV on *C. albicans* was evaluated by the cfu/mL count obtained after the cultivation of samples collected after 7 days of action of the drugs within the root canals of the specimens. The results achieved demonstrated that in the absence of antimicrobial substance, only with the use of propylene glycol (GI) positive control, *C. albicans* infected the dentinal tubules in both depths of evaluated root dentin (Figure 2a and b). The contamination was more intense in the most superficial extension of the dentin, due to the proximity with the main canal. The application of medication in the root canal provided a significant reduction in the cfu/mL count in relation to the control group with the other groups, in the most superficial depth (Table 1). The substances had the following performances, after statistical analysis: GII (P=0.02) (Figure 2c), GIII (P=0.001) (Figure 2d) and GIV (P=0.02) (Figure 2e). The comparison between the medications revealed a variation in the antimicrobial performance on *C. albicans*, and the GIII showed a statistically significant reduction in relation to the other groups (P=0.01) (Figure 3a). In the dentin portion evaluated more internally, there was also a statistically significant difference in all groups in relation to the control group (Table 2). However, GIII (P=0.01) and GIV (P=0.01) showed a difference in relation to GII (P=0.04) (Figure 3b).

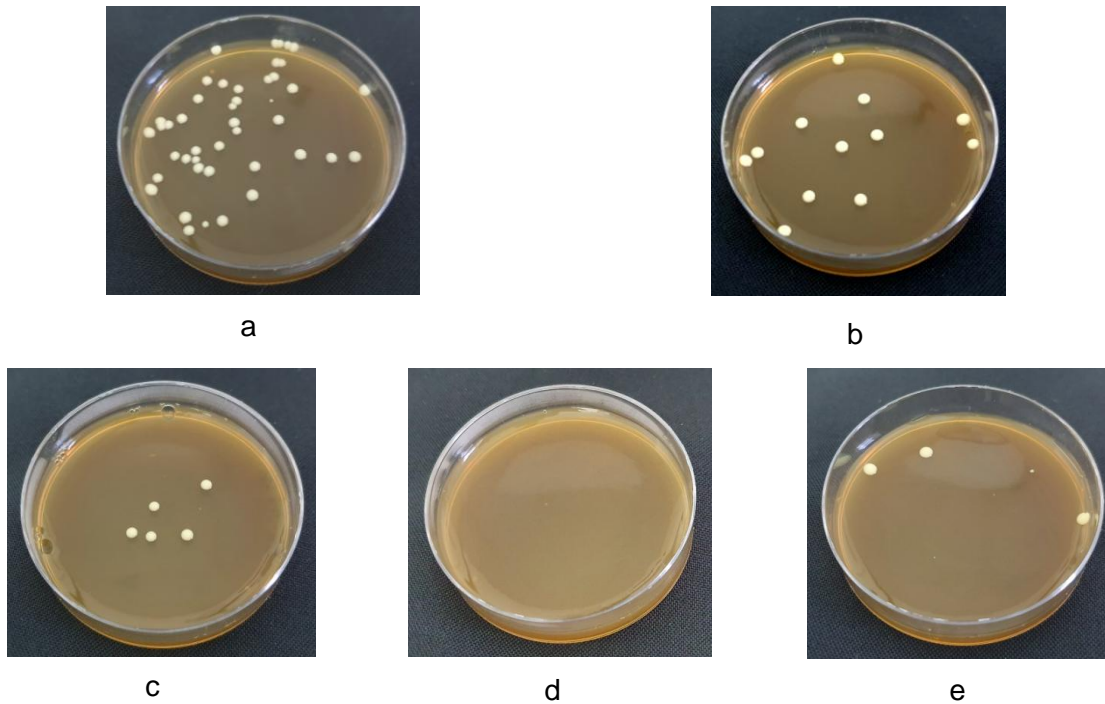


Figure 2. *C. albicans* colonies in SBDA after 48 h of culture at 35 °C. Illustration of the recovery of the colony-forming units (cfu/mL) of *C. albicans*: (a) Collection of dentin close to the main canal, GG# 5, (GI: propylene glycol). (b) Collection of the most internal dentin to the main canal, GG# 6, (GI: propylene glycol). (c) GII: Ca(OH)₂. (d) GIII: CHX. (e) GIV: Ca(OH)₂+EE.

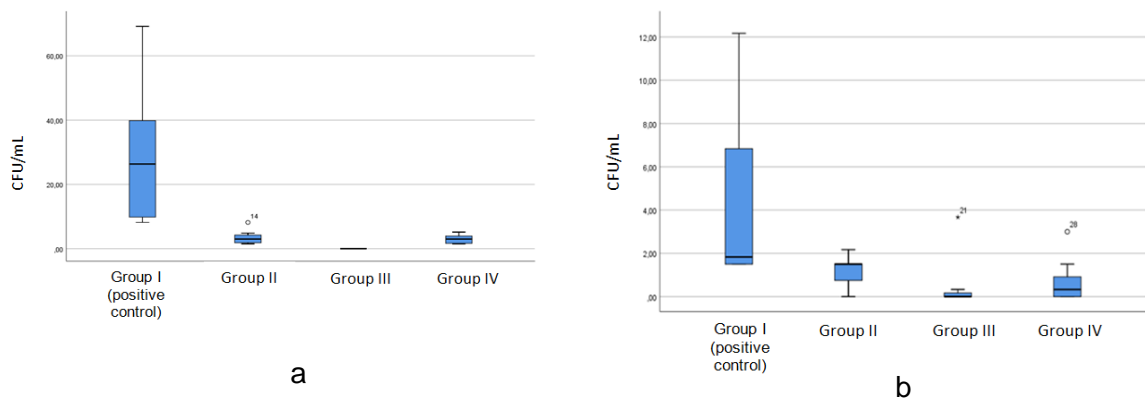


Figure 3. Number of cfu/mL of *C. albicans* recovered from dentine treated with different substances used as an intracanal medication compared to the control group. (a) Collection of dentin from the superficial portion. (b) Collection of the innermost dentin. GI=propylene glycol, GII=Ca(OH)₂, GIII=CHX, GIV=Ca(OH)₂ + EE.

Table 1. Comparisons between groups - collection in the superficial portion.

Variable	Group I (n=7)	Group II (n=7)	Group III (n=7)	Group IV (n=7)
Md (25-75%)	26.3 (8.83;40.5)	3.0 (1.5;4.8) 0.02^a	0.0 (0.0;0,0) 0.001^b 0.01^d	3.0 (1.5;4.5) 0.02^c

Kruskal-Wallis test, Md = median; 25-75% = quartiles, statistically significant difference $P \leq 0.05$.

^a Statistically significant difference $P=0.02$ between GI and GII.

^b Statistically significant difference $P=0.001$ between GI and GIII.

^c Statistically significant difference $P=0.02$ between GI and GIV.

^d Statistically significant difference $P=0.01$ between GIII with GII and GIV.

Table 2. Comparisons between groups - collection in the deepest portion.

Variable	Group I (n=7)	Group II (n=7)	Group III (n=7)	Group IV (n=7)
Md (25-75%)	1.8 (1.5;10.0)	1.5 (0.0;1.5) 0.04^a	0.0 (0.0;0.3) 0.01^b	0.3 (0.0;1.5) 0.01^b

Kruskal-Wallis test, Md = median; 25-75% = quartiles, statistically significant difference $P \leq 0.05$.

^a Statistically significant difference $P=0.04$, when comparing GI with GII.

^b Statistically significant difference $P=0.01$, when GI is compared with GIII and GIV.

Discussion

The eradication of microorganisms and their by-products from the root canal system, in cases of persistent infections, is essential for a favorable endodontic treatment result to occur. The complex anatomy of the root canals and the difficulty of accessing the instruments in these places make disinfection difficult. Therefore, it is necessary to medicate these channels with an effective microbial agent after the preparation phase. The need for medication is even greater in these cases.^{21,22} *Candida* species, particularly *C. albicans*, are versatile

pathogens, capable of surviving as commensals in several anatomical areas of the body²³, such as the dental pulp²⁴. Therefore, this was the test microorganism used in this study due to its high prevalence in cases of persistent infections.

The use of conventional antimicrobial agents in the treatment of infected root canals has become limited due to increased rates of resistance and reduced antimicrobial action.^{25,26} Therefore, there is a need to develop alternative antimicrobial agents to control endodontic infections.

Several studies have evaluated the biological activities of *C. longa*. Curcumin nanoparticles have multiple activities, such as inhibiting inflammation and bone resorption in experimental periodontitis. In vitro and in vivo studies demonstrate that curcumin attenuates inflammation and degradation of connective tissue in periodontitis.²⁷ Curcumin showed great potential for photodynamic action against oral bacteria, fungi and strains resistant to conventional drugs.²⁸

In the present study, the EE of *C. longa* showed biological activity against *C. albicans* (ATCC 18804) with a MIC of 32 µg/mL, when determined by the broth microdilution test. Also compared to *C. albicans* (ATCC 18804), the MIC found for curcumin was 64 µg/mL.⁴ Another similar study determined a MIC of 512 µg/mL for pure curcumin and extracts of *C. longa* against *C. albicans*.²⁹

Clinical studies in the oral cavity demonstrate the biological activities of *C. longa*. In studies of inhibition of adhesion to human oral epithelial cells of yeasts of the genus *Candida*, it was found that curcumin was 2.5 times more potent than fluconazole in inhibiting the adhesion of *C. albicans* and *C. parapsilosis* to oral epithelial cells.⁴ The local application of curcumin resulted in antimicrobial agents and anti-inflammatory effects, indicated by a significant decrease in the periodontitis index.³⁰ While the topical application of nanocurcumin acts as an adjunct in the gingival sulcus of diseased areas in periodontitis treatments and has activity antimicrobial against cariogenic bacteria³¹, in endodontics, plant extracts were evaluated as endodontic irrigators against *E. faecalis* and *C. albicans*.³²

Several studies have confirmed that Ca(OH)₂ does have a lethal effect on microorganisms.³³ Its mechanism of action is the result of the dissociation of hydroxyl and calcium ions, with a consequent increase in pH, which gives it an antimicrobial and inducing action mineralization, with the possibility of repairing adjacent periapical tissues.³⁴

However, this effect was only observed when the substance was placed in direct contact with microorganisms, a situation in which the concentration of hydroxyl ions is maximum, reaching levels incompatible with microbial survival. Some species such as *E. faecalis* and *C. albicans* may show resistance to Ca(OH)_2 when used as an intracanal medication.³⁵ In the present study, there was a statistically significant difference for Ca(OH)_2 ($P=0.02$) and its association with EE ($P=0.02$) in reducing the number of cfu/mL of *C. albicans* in relation to the propylene glycol control group, when the colony count was made from a more superficial sample of the root canal. The CHX gel 2% had the best performance in this reduction in comparison with the GI ($P=0.001$) and with the other groups ($P=0.01$). Although CHX was more effective than the other groups, in this more superficial area of the root canal, the evaluation of the most internal collection demonstrated that it had a similar result to the Ca(OH)_2 +EE group, with a statistically significant difference ($P=0.01$) for both groups, when all groups were compared with the GI (control). These results suggest the effectiveness of the combination of Ca(OH)_2 +EE to reduce the microorganisms that are present in the innermost layers of the dentinal tubules, as it was superior to the Ca(OH)_2 group ($P=0.04$) alone and similar to the CHX result.

Antimicrobial agents used as root canal medications must have low toxicity, otherwise they can prevent the healing of periapical tissues. Some studies have shown that CHX can be cytotoxic to human fibroblasts³⁶, human periodontal ligament cells³⁷, alveolar bone cells³⁸ and human osteoblastic cells.³⁹

Taking into account the possible cytotoxic effects of CHX as an antimicrobial agent and the *in vitro* result that this study demonstrated, when the *C. longa* extract was associated with Ca(OH)_2 , new *in vitro*, *ex vivo* studies should be developed to compare the biological activity of the extract of *C. longa* against *E. faecalis* and then to be extrapolated for a randomized clinical trial of refractory endodontic infections.

Conclusion

This *in vitro* and *ex vivo* study concluded that 2% CHX gel showed the best antifungal activity against *C. albicans* in the superficial portion of the root canal dentin compared to propylene glycol, Ca(OH)_2 and Ca(OH)_2 associated with EE. In

the deepest portion of the root canal dentin, Ca(OH)₂+EE and 2% CHX gel showed similar antimicrobial activity for *C. albicans*.

Acknowledgments

To the Centro Universitário UNISEP campus Francisco Beltrão for technical support and the company Eurodonto-TDK for the supply of endodontic files used in the research.

Study limitations

Because there is no formulation of curcuma for clinical use, it is suggested that if the results of randomized clinical trials show effectiveness, companies develop formulations suitable for dental practice.

References

- 1.Subbiah U, Elango S, Jayesh R. Herbals and green synthesized nanoparticles in dentistry. *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*. Elsevier. 2019:617-46.
- 2.Waghmare PF, Chaudhari AU, Karhadkar VM, Jamkhande AS. Comparative evaluation of turmeric and chlorhexidine gluconate mouthwash in prevention of plaque formation and gingivitis: a clinical and microbiological study. *J Contemp Dent Pract*. 2011;12(4):221-4.
- 3.Ferreira MRA, Santiago RR, Langassner SZ, Mello JCP, Svidzinsk TIE, Soares LAL. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. *J Med Plants Res*. 2013;7(40):3008-13.
- 4.Martins CVB, Da Silva DL, Neres ATM, Magalhães TFF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;63(2):337-39.
- 5.Prabhakar AR, Taur S, Hadakar S, Sugandhan S. Comparison of antibacterial efficacy of calcium hydroxide paste, 2% chlorhexidine gel and yumeric extract as

an intracanal medicament and their effect on microhardness of root dentin: an in vitro Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2013;6(3):171-77.

6.Nair PNR, Sjögren U, Schumacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. *International Endodontic Journal*. 1993;26(4):225-33.

7.Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2004;97(1):85-94.

8.Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Brazilian oral research*. 2017;31.

9.Waltimo TM, Ørstavik D, Siren EK. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *International Endodontic Journal*. 1999;32:421-29.

10.Siqueira Jr JF, Rôças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *Journal of Oral Microbiology*. 2009;10(1):1-12.

11.Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *Journal of endodontics*. 2000;26(12):751-55.

12.Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by highresolution computed tomography. *Journal of Endodontics*. 2001;27(1):1-6.

13.Rezende GC, Massunari L, Queiroz IODA, Gomes Filho JE, Jacinto RC, Lodi CS, et al. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Brazilian oral research*. 2016;30(1).

- 14.Siqueira Jr JF, Rôças IN, Magalhães FA, De Uzeda M. Antifungal effects of endodontic medicaments. *Australian Endodontic Journal*. 2001;27(3):112-14.
- 15.Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011;44(8):697-30.
- 16.Sathorn C, Parashos P, Messer HH. Effectiveness of single-versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal*. 2005;38(6):347-55.
- 17.Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;234(2):256-65.
- 18.Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in vitro*. 2008;22(2):308-17.
- 19.Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. M27-A2. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras: Norma Aprovada - 2 Edição. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002 Wayne;22(15):1-44.
- 20.Atila-Pektaş B, Yurdakul P, Gülmez D, Görduysus Ö. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *International Endodontic Journal*. 2013;46(5):413-18.
- 21.Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *International Endodontic Journal*. 2004;37(5):311-19.

22. Siqueira Jr JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2004;97(5):632-41.
23. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327-35.
24. Kumar KN, Venkataramana M, Allen JA, Chandranayaka S, Murali HS, Batra HV. Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. *LWT-Food Science and Technology*. 2016;69:522-28.
25. Sousa BCD, Gomes FDA, Ferreira CM, Rocha MMDNP, Barros EB, Albuquerque DSD. Persistent extra-radicular bacterial biofilm in endodontically treated human teeth: scanning electron microscopy analysis after apical surgery. *Microscopy research and technique*. 2017;80(6):662-67.
26. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in endodontics—current status and future directions. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1748.
27. Zambrano LM, Brandao DA, Rocha FR, Marsiglio RP, Longo IB, Primo FL, et al. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
28. Santezi C, Reina BD, Dovigo LN. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2018;21:409-15.
29. Cikrikci S, Mozioglu E, Yilmaz H. Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Records of Natural Products*. 2008;2(1):19-24.
30. Elavarasu S, Suthanthiran T, Thangavelu A, Alex S, Palanisamy VK, Kumar TS. Evaluation of superoxide dismutase levels in local drug delivery system

containing 0.2% curcumin strip as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis: A clinical and biochemical study. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2016;8(Suppl 1):S48.

31.Sodagar A, Bahador A, Pourhajibagher M, Ahmadi B, Baghaeian P. Effect of addition of curcumin nanoparticles on antimicrobial property and shear bond strength of orthodontic composite to bovine enamel. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*. 2016;13(5):373.

32. Vinothkumar TS, Rubin MI, Balaji L, Kandaswamy D. In vitro evaluation of five different herbal extracts as an antimicrobial endodontic irrigant using real time quantitative polymerase chain reaction. *Journal of conservative dentistry: JCD*. 2013;16(2):167-70.

33.Sjögren U, Figdor D, Spångberg L. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal*. 1991;24:119-25.

34.Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011;44(8):697-730, 2011.

35.Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J*. 1999;32:94-8.

36.Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1993;62:526-32.

37.Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2001;91(2):230-34.

38.Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone–iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clinical oral investigations*. 2007;11(2):155-64.

39.Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010;43(5):430-35.

6. APÊNDICES

A toxicidade foi avaliada por meio do teste de hemólise com a finalidade de verificar e comparar o extrato etanólico da *C. longa* e o solvente (DMSO+metanol) com as demais substâncias: clorexidina, hidróxido de cálcio e óleo essencial da *C. longa* utilizadas nos testes *in vitro*. As concentrações testadas (10x, 1x e 0,1x) estão representadas na Figura 24.

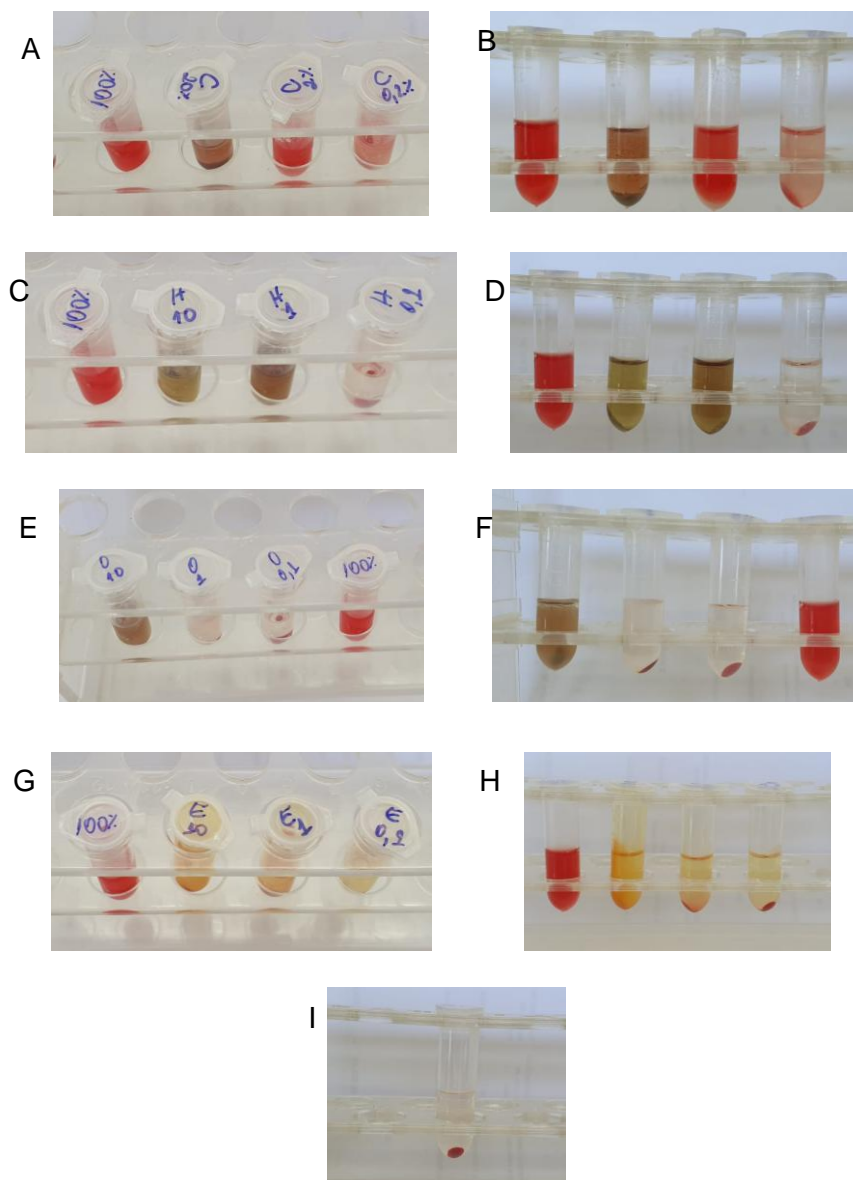


Figura 24. Substâncias utilizadas no teste de hemólise. (A e B) Clorexidina. (C e D) Hidróxido de cálcio. (E e F) Óleo essencial. (G e H) Extrato etanólico. (I e J) Solvente (DMSO+metanol).

Fonte: Autor, 2019.

7. ANEXOS

ANEXO I

Normas da revista *Brazilian Oral Research*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Missão, escopo e política de submissão
- Apresentação do manuscrito
- Características e formatação dos tipos de manuscritos
- Termo de transferência de direitos autorais e declarações de responsabilidade
- Custo para publicação
- Exemplos de referências

MISSÃO, ESCOPO E POLÍTICA DE SUBMISSÃO

A *Brazilian Oral Research* - BOR (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da *International Association for Dental Research* - IADR). A revista tem classificação B1 Qualis Capes (Odontologia), Fator de Impacto™ 0,937 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A BOR convida à submissão os seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou *Short Communication*), Revisão Crítica da Literatura, Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à BOR.

A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações.

Importante: Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês. Para conhecer as empresas recomendadas, entre em contato com bor@sbpgo.org.br. Os autores deverão encaminhar o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida. Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não forneçam o certificado. Exceção a esta regra é feita quando o autor de correspondência é *native English speaker*.

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne™ permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela **BOR**. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (*Title Page*), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (*Title Page*; dados obrigatórios)

- Indicação da especialidade*, ou área de pesquisa, enfocada no manuscrito.

*Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatrics; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

- Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.

- Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos números de telefone e endereços eletrônicos (email). Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados na Folha de Rosto (*Title Page*) com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades.
- A participação de cada um dos autores deverá ser justificada por escrito em folha separada, observando-se os critérios de autoria e co-autoria adotados pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, disponíveis em <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>
- Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso, departamento, cidade, estado e país, apresentados de acordo com as normas internas de citação estabelecidas pela instituição de cada um dos autores. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne™.

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (mas sem sub-divisões em seções), contendo proposição do trabalho, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta *Special characters* para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <http://decs.bvs.br/> ou <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> (não serão aceitos sinônimos).

Texto Principal

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os

métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE (<http://stroke-statement.org/>) e o check list deve ser submetido. Ensaios clínicos devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da *CONSORT Statement* (<http://www.consort-statement.org/>), revisões sistemáticas e meta-análises devem seguir o PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>), ou Cochrane (<http://www.cochrane.org/>).

Ensaio Clínico

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT disponíveis em www.consort-statement.org. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro gênico, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de

dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à BOR. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>
- EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>
- DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

As submissões de manuscritos que incluam dados de *microarray* devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment* - <http://www.mged.org/index.html>) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

- ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
- GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou RTF.

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

Plágio

A BOR emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados. Referências: só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares. Não serão aceitos como referências manuscritos em processo de redação, dissertações, teses, ou resumos apresentados em congressos. Devem ser evitadas referências a livros.

As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, conforme apresentadas em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Grafia de termos científicos: nomes científicos (binômios de nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica) devem ser escritos por extenso, bem como os nomes de compostos e elementos químicos, na primeira menção no texto principal.

Unidades de medida: devem ser apresentadas de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (<http://www.bipm.org> ou <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Notas de rodapé no texto principal: devem ser indicadas por meio de asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF. Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (não inseridas no arquivo de texto). As figuras devem ser numeradas e citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

CARACTERÍSTICAS E FORMATAÇÃO DOS TIPOS DE MANUSCRITOS

Pesquisa Original

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação - Arquivos de Texto

- Folha de rosto (*Title Page*)
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Tabelas

- Referências - máximo de 40 referências
- Legendas de figuras

Formatação - Arquivos de figuras

- Figuras - máximo de 8 (oito) figuras, conforme descrito acima.

Carta ao Editor

Cartas devem incluir evidências que sustentem a opinião do(s) autor(es) sobre o conteúdo científico ou editorial da BOR, e ser limitadas a 500 palavras. Figuras ou tabelas não são permitidas.

TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS E DECLARAÇÕES DE RESPONSABILIDADE

O manuscrito submetido para publicação deve ser acompanhado do Termo de Transferência de Direitos Autorais e Declarações de Responsabilidade, disponível no sistema online e de preenchimento obrigatório.

"CHECKLIST" PARA SUBMISSÃO INICIAL

- Arquivo de folha de rosto (*Title Page*, em formato DOC, DOCX ou RTF).
- Arquivo do texto principal (*Main Document*, manuscrito), em formato DOC, DOCX ou RTF.
- Tabelas, em formato DOC, DOCX ou RTF.
- Declaração de interesses e de financiamento, submetida em um documento separado e em formato PDF. (se aplicável)
- Justificativa para a participação de cada um dos autores, fornecida em um documento separado e em formato PDF.
- Fotografias, micrografias e radiografias (largura mínima de 10 cm e resolução mínima de 500 DPI) em formato TIFF. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/>)
- Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais em formato PDF.

- Cada uma das figuras deve ser submetida em arquivos separados e individuais (não inseridas no arquivo de texto).

Custo para publicação

Os autores não são submetidos a uma taxa de submissão de artigos e de avaliação.

ANEXO II

Comprovante de submissão - revista Brazilian Oral Research

16/04/2020 ScholarOne Manuscripts

☰ Brazilian Oral Research

🏠 Home

✍ Author

Submission Confirmation Print

Thank you for your submission

Submitted to
Brazilian Oral Research

Manuscript ID
BOR-2020-0364

Title
Evaluation of the association of calcium hydroxide and Curcuma longa extract as an endodontic medication

Authors
Moreno, Sandriane
Panis, Carolina
Martins, Cleide
Olguin, Conceição
Junior, Emyr
Casaril, Kêrley
Marmilh, Lucas
De Carl, Caroline

Date Submitted
16-Apr-2020

Author Dashboard

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2020. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.
🐦 @ScholarOneNews | 🖨️ System Requirements | 🔒 Privacy Statement | ⚖️ Terms of Use

Brazilian Oral Research - Manuscript ID BOR-2020-0364

Cristina Leitão <onbehalf@manuscriptcentral.com>

23:30 (há 33 minutos)

para mim, carolpanis, cvbmartins, cfolguin, juniorstrin, kcasaril, lucas.aodonto, k.carli91

16-Apr-2020

Dear Mrs. Moreno:

Your manuscript entitled "Evaluation of the association of calcium hydroxide and Curcuma longa extract as an endodontic medication" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Oral Research.

Your manuscript ID is BOR-2020-0364.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Oral Research.

Sincerely,
Brazilian Oral Research Editorial Office

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
04/08/2000

Aprovado na
CONEP em

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do Projeto: Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade antimicrobiana da Curcumina e do óleo essencial da *Curcuma longa* em associação com outras medicações intracanaís frente aos microorganismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.

Pesquisador responsável e colaboradores com telefones de contato: Sandriane Moreno (46 99974-0972), Cleide Viviane Buzanello Martins (31 9871-9581)

Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do Açafraão da terra, seu pó, conhecido como curcumina e seu óleo essencial, contra alguns microorganismos presentes no canal radicular (do dente), para isso será realizado testes em dentes extraídos.

Durante a execução do projeto necessitamos dos dentes extraídos por motivos que não permitiram outros tratamentos nesses dentes, os quais foram indicados à extração. Como a pesquisa será em laboratório, os riscos para o paciente serão mínimos. Uma vez que o paciente autorize a utilização do(s) seu(s) dente(s) extraído(s), seu anonimato será garantido e os dentes serão armazenados de forma segura na Unioeste/Campus de Francisco Beltrão. Esta pesquisa tem como finalidade a busca de novas medicações para serem usadas em tratamento de canal. Sua identidade não será divulgada e seus dados serão tratados de maneira sigilosa, sendo utilizados apenas para fins científicos. Você também não pagará nem receberá para participar do estudo. Além disso, você poderá cancelar sua participação na pesquisa a qualquer momento. No caso de dúvidas ou da necessidade de relatar algum acontecimento, você pode contatar os pesquisadores pelos telefones mencionados acima ou o Comitê de Ética pelo número 3220-3092. Este documento será assinado em duas vias, sendo uma delas entregue ao sujeito da pesquisa. Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto.

Eu, Sandriane Moreno, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

_____, _____ de _____ de 2019.

Nome do doador:

Assinatura do doador

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
04/08/2000

Aprovado na
CONEP em

ANEXO IV

TERMO DE ASSENTIMENTO – TA (Adolescentes ≥ 13 anos e ≤ 18 anos)

Título do Projeto: Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade antimicrobiana da curcumina e do óleo essencial da *Curcuma longa* em associação com outras medicações intracanais frente aos micro-organismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.
(Avaliação do açáfrão sobre micro-organismos do canal dos dentes).

Pesquisador responsável e colaboradores com telefones de contato: Sandriane Moreno (46 99974-0972), Cleide Viviane Buzanello Martins (31 9871-9581).

Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do Açáfrão da terra, seu pó, conhecido como curcumina e seu óleo essencial, contra alguns microrganismos presentes no canal radicular (do dente), para isso será realizado testes em dentes extraídos.

Para participar deste estudo, o seu responsável legal deverá autorizar a sua participação mediante a assinatura de um Termo de Consentimento. A não autorização do seu responsável legal invalidará este Termo de Assentimento e você não poderá participar do estudo.

Durante a execução do projeto necessitamos dos dentes extraídos por motivos que não permitiram outros tratamentos nesses dentes, os quais foram indicados à extração. Como a pesquisa será em laboratório, os riscos para o paciente serão mínimos. Uma vez que o paciente autorize a utilização do(s) seu(s) dente(s) extraído(s), seu anonimato será garantido e os dentes serão armazenados de forma segura na Unioeste/Campus de Francisco Beltrão. Esta pesquisa tem como finalidade a busca de novas medicações para serem usadas em tratamento de canal. Sua identidade não será divulgada e seus dados serão tratados de maneira sigilosa, sendo utilizados apenas para fins científicos. Você também não pagará nem receberá para participar do estudo. Além disso, você poderá cancelar sua participação na pesquisa a qualquer momento. No caso de dúvidas ou da necessidade de relatar algum acontecimento, você pode contatar os pesquisadores pelos telefones mencionados acima ou o Comitê de Ética pelo número 3220-3092. Este documento será assinado em duas vias, sendo uma delas entregue ao sujeito da pesquisa. Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto.

Eu, Sandriane Moreno, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

_____, _____ de _____ de 2019.

Nome do doador:

Assinatura do doador

ANEXO V

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa.

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO E EX VIVO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CURCUMINA E DO ÓLEO ESSENCIAL DA CURCUMA LONGA EM ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS CANDIDA ALBICANS E ENTEROCOCCUS FAECALIS.

Pesquisador: SANDRIANE MORENO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14116519.6.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.362.737

Apresentação do Projeto:

A pesquisa intitulada AVALIAÇÃO IN VITRO E EX VIVO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PÓ E ÓLEO ESSENCIAL DA CURCUMA LONGA LINEU EM ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS FRENTE AOS MICRORGANISMOS CÂNDIDA ALBICANS (ROBIN) BERKHOUT E ENTEROCOCCUS FAECALIS sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) SANDRIANE MORENO e número de CAAE 14116519.6.0000.0107 ENCONTRA-SE DE ACORDO com as normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme normativas do Sistema CEP/CONEP. Trata-se de um estudo de caráter experimental onde serão realizados teste in vitro e ex vivo para avaliar a atividade biológica tanto da curcumina quanto do óleo essencial da curcuma longa, utilizando-se dente extraídos provenientes de doação e que serão infectados com micro-organismos Enterococcus faecalis, cedidos pelo Instituto de Ciências e Tecnologia (UNESP) e Candida albicans ATCC 18804. Após, nesses espécimes contaminados, a curcumina, na forma de pó, o óleo essencial e o hidróxido de cálcio em associação, irão preencher os canais radiculares, como uma forma de tratamento e posteriormente, serão realizadas coletas dos micro-organismos para analisar se houve atividade biológica contra os micro-organismos testados. A equipe da pesquisa respeita os sujeitos da pesquisa que colaborarem com a doação do dente extraído, visto que o mesmo só será feita após a assinatura do TCLE ou TA, bem como, descreve os riscos

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 2069

Bairro: UNIVERSITARIO

CEP: 85.819-110

UF: PR

Município: CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3092

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

Continuação do Parecer: 3.362.737

mínimos aos participantes onde o anonimato será garantido e os dentes serão armazenado de forma segura na UNIOESTE/Campus de Francisco Beltrão.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, in vitro e ex vivo, a atividade antimicrobiana da Curcuma longa frente aos microrganismos Enterococcus faecalis e Candida albicans.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa ENCONTRA-SE DE ACORDO a resolução 466/12 quanto aos Riscos e Benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa enviada a este CEP possui relevância social e científica, sendo de relevância para Área de Ciências da Saúde. O Projeto está bem escrito e cumpre as demandas do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram corretamente anexados e ESTÃO DE ACORDO com os critérios éticos exigidos. As autorizações estão assinadas, datadas e carimbadas e o TCLE/TA contemplam todos os itens exigidos, sendo claro, objetivo e informativo quanto aos procedimentos que serão realizados durante a coleta do material extraído.

Recomendações:

Recomenda-se que o pesquisador siga fielmente os procedimentos metodológicos descritos no projeto, bem como envie relatório final ao término da pesquisa. Caso haja alguma modificação no projeto, este CEP deverá ser informado por meio de emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Esta pesquisa encontra-se APROVADA e não possui pendências ou lista de inadequações.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1321069.pdf	16/05/2019 09:16:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETO_COMITE_DETALHADO.docx	16/05/2019 09:01:28	SANDRIANE MORENO	Aceito

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 2069
Bairro: UNIVERSITARIO CEP: 85.819-110
UF: PR Município: CASCAVEL
Telefone: (45)3220-3092 E-mail: cep.prppg@unioeste.br

Continuação do Parecer: 3.362.737

Investigador	PROJETO_COMITE_DETALHADO.docx	16/05/2019 09:01:28	SANDRIANE MORENO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_SANDRIANE.docx	16/05/2019 09:00:56	SANDRIANE MORENO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SANDRIANE.docx	16/05/2019 08:27:14	SANDRIANE MORENO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO.docx	16/05/2019 08:23:32	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_Ciencia_DO_RESPONSIVEL_Pelo_Campo_De_Estudo_Universitario_NISEP.pdf.pdf	16/05/2019 08:02:09	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_Ciencia_DO_RESPONSIVEL_Pelo_Campo_De_Estudo_Universitario_Prefeitura.pdf.pdf	16/05/2019 08:00:50	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_Ciencia_DO_RESPONSIVEL_Pelo_Campo_De_Estudo_Universitario_BO.pdf.pdf	16/05/2019 08:00:31	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_USO_DE_DADOS_EM_ARQUIVO.pdf	16/05/2019 08:00:15	SANDRIANE MORENO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DO_PESQUISADOR_RESPONSIVEL_DE_QUE_A_COLETA_NAO_FOI_INICIADA.pdf.pdf	16/05/2019 07:59:50	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_Ciencia_DO_RESPONSIVEL_Pelo_Campo_De_Estudo_Universitario_NISEP.docx	16/05/2019 07:55:58	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_USO_DE_DADOS_EM_ARQUIVO.docx	12/05/2019 20:59:49	SANDRIANE MORENO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DO_PESQUISADOR_RESPONSIVEL_DE_QUE_A_COLETA_NAO_FOI_INICIADA.docx	12/05/2019 20:58:03	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_Ciencia_DO_RESPONSIVEL_Pelo_Campo_De_Estudo_Universitario_Prefeitura.docx	12/05/2019 20:57:37	SANDRIANE MORENO	Aceito
Outros	TERMO_DE_Ciencia_DO_RESPONSIVEL_Pelo_Campo_De_Estudo_Universitario_BO.docx	12/05/2019 20:56:53	SANDRIANE MORENO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Sandriane.pdf	12/05/2019 20:34:22	SANDRIANE MORENO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 2069
Bairro: UNIVERSITARIO CEP: 85.819-110
UF: PR Município: CASCAVEL
Telefone: (45)3220-3092 E-mail: cep.prppg@unioeste.br

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.362.737

Não

CASCADEL, 01 de Junho de 2019

Assinado por:
Dartel Ferrari de Lima
(Coordenador(a))