

**Escola de Ciências
da Saúde**



Rodrigo da Silva Oliveira Pinto

**Citotoxicidade de cimentos endodônticos enriquecidos com óleo essencial de
melaleuca**

**Duque de Caxias, RJ
2021**

Rodrigo da Silva Oliveira Pinto

**Citotoxicidade de cimentos endodônticos enriquecidos com óleo
essencial de melaleuca**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio “Professor José de Souza Herdy”,
como parte dos requisitos parciais para
obtenção do grau de bacharel em
Odontologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sara Gemini Piperni

**Duque de Caxias, RJ
2021**

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

P659c Pinto, Rodrigo da Silva Oliveira.
 Citotoxicidade de cimentos endodônticos enriquecidos com óleo essencial
 de melaleuca / Rodrigo da Silva Oliveira Pinto. – Duque de Caxias, 2021.
 22 f. : il. ; 30 cm.

 Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Odontologia) –
 Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências
 da Saúde, 2021.
 “Orientadora: Prof.^a Anna Paula Martins”.
 Referências: f. 15-18.

 1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Cimentos ósseos. 4. Óleo de melaleuca.
 5. Tratamento do canal radicular. I. Martins, Anna Paula. II. Universidade do
 Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD – 617.6

Rodrigo da Silva Oliveira Pinto

**Citotoxicidade de cimentos endodônticos enriquecidos com óleo
essencial de melaleuca**

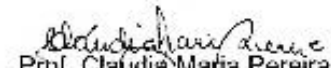
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do
Grande Rio "Professor José de Souza
Herdy", como parte dos requisitos
parciais para obtenção do grau de
bacharel em Odontologia

Aprovado em 25 de junho de 2021

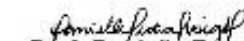
Banca Examinadora



Prof. Sara Gemini Piperni
Universidade do Grande Rio



Prof. Cláudia Maria Pereira
Universidade do Grande Rio



Prof. Danielle Dutra Voigt
Universidade do Grande Rio

Duque de Caxias, RJ

2021

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
1.1	O canal radicular	4
1.2	Cimentos Obturadores Endodônticos	6
1.2.1	Cimentos à base de Óxido de Zinco e Eugenol (OZE)	6
1.2.2	Cimento à base de Resina epóxica	6
1.2.3	Óleos essenciais nos cimentos endodônticos	7
2	MATERIAIS E METODOS	8
2.1	Preparação de cimentos	8
2.2	Realização dos extratos	9
2.3	Cultura celular	9
2.4	Exposição aos cimentos	9
2.5	Ensaio de citotoxicidade	9
3	RESULTADOS	10
3.1	Ensaio de citotoxicidade	10
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
	ANEXO I	19

RESUMO

Dentro dos cimentos endodônticos mais usados na odontologia para o vedamento tridimensional dos canais radiculares encontramos o Endofill, a base de óxido de zinco e eugenol, com propriedades antibacterianas, baixa capacidade de adesão e baixo escoamento e o cimento a base de resina epóxica AH Plus, da classe das epoxiaminas. A indústria busca inovação na criação de novos materiais que possam melhorar as propriedades físico químicas dos cimentos usados na prática clínica. Dentro das modificações cobiçadas pelos pesquisadores um crescente interesse envolveu a incorporação em cimentos endodônticos de óleos essenciais, para desfrutar das propriedades benéficas destes compostos, como o potencial de atividade antimicrobiana, antifúngica, ação antineoplásica, analgésica e anti-inflamatória. O óleo essencial de Melaleuca é particularmente interessante neste sentido devido a sua propriedade antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis*, o principal microorganismo encontrado em casos de retratamento de canal. Dessa forma, o objetivo do trabalho é avaliar a citotoxicidade em células humanas do óleo essencial de Melaleuca adicionado aos cimentos endodônticos Endofill e AH Plus. Os cimentos endodônticos foram incorporados com o óleo essencial de melaleuca, nas concentrações de 2% e 5% e, após secos foram colocados em contato com meio de cultivo durante 24 horas e diluídos 1:2, 1:4, 1:8, 1:60, 1:200 para exposição aos fibroblastos. Após a exposição aos fibroblastos humanos, o óleo essencial de melaleuca incorporado ao Endofill e o AH Plus pura e nas concentrações de 2% e 5% mostraram ausência de citotoxicidade. A melaleuca pura, 2% e 5 % mostraram uma alta toxicidade até a diluição de 1:60, com valores de viabilidade similares ao controle positivo (morte celular). Já as diluições de 1:60 e de 1:200 não mostraram citotoxicidade. Com isso, os cimentos incorporados com melaleuca se mostram promissores para o uso em endodontia.

Palavras-chave: Tratamento de canal. Óleo essencial de melaleuca. Endodontia.

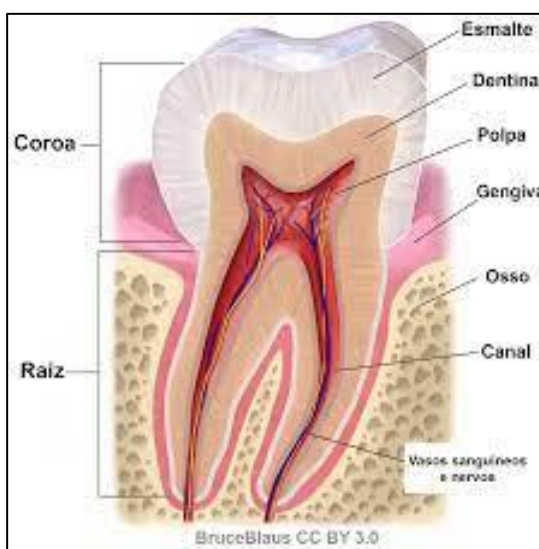
ABSTRACT

Among the most used endodontic cements in dentistry for the three-dimensional sealing of root canals, Endofill, based on zinc oxide and eugenol, with antibacterial properties, low adhesion capacity and low flow, and the cement based on epoxy resin AH Plus, from the class of epoxyamines, play a central role. The industry aims to create new materials to improve the physical chemical properties of cements used in clinical practice. Among the modifications investigated by researchers, a growing interest involved the incorporation of essential oils in endodontic cements, to enjoy the beneficial properties of these compounds, such as the potential of antimicrobial, antifungal, anticancer, analgesic, anti-inflammatory action. Particularly, Melaleuca essential oil, is interesting due to its antibacterial property against *Enterococcus faecalis*, the main bacterium in endodontic recurrence cases. Thus, the aim of this work is to evaluate the cytotoxicity in human cells of Melaleuca essential oil added to endodontic sealers, Endofill and AH Plus. The endodontic cements were incorporated with tea tree essential oil at concentrations of 2% and 5% and, after drying, they were placed in contact with the culture medium for 24 hours and diluted 1:2, 1:4, 1:8, 1 :60, 1:200 for cell display. After fibroblast exposition cement showed not toxic to primary fibroblast cells. However, pure Melaleuca 2% and 5% showed high toxicity up to the 1:60 dilution, and no toxicity in 1:60 and 1:200 dilutions. Thus, cements incorporated with Melaleuca oil are promising for use in endodontics.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O canal radicular

O canal radicular (polpa dentária) é uma estrutura responsável pela vitalidade do elemento dentário, porque através dela vasos sanguíneos, fibras e nervos entram na cavidade oral. A polpa dentária e a dentina, um tecido mineralizado que constitui grande parte do tecido dentário formam o complexo dentino-pulpar, localizada na porção radicular do dente (1).



Legenda: O dente é uma estrutura formada por uma raiz, um colo e uma coroa. Na imagem podemos observar o complexo dentino-pulpar revestido por dentina e esmalte. Fonte: modificado de https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTM-pUNCSEvkLiJMExp2TuALZjwEEExtaqDiXmDbDSiVIaVoXYOvAi62quqwwvDF_5Nqi-0&usqp=CAU.

A anatomia dental externa é formada por 70% de matéria inorgânica cristalina, constituída principalmente por cristais de hidroxiapatita em formato de placas, 20% de matéria orgânica e 10% de esmalte. O esmalte é o tecido mais mineralizado, seguido pela dentina, o cemento e o osso (2).

Os componentes da anatomia dental interna são: cavidade pulpar (câmara pulpar e canal radicular), ápice radicular, vértice radicular e forame apical. A cavidade pulpar é o espaço no qual é presente a polpa dentária, situada na porção central dos dentes. Esta é limitada pela dentina coronária e pela dentina radicular e se divide em: câmara pulpar e canal radicular. A câmara pulpar é composta de assoalho, cornos pulpares, paredes e teto, possuindo mais faces nos dentes posteriores. Ela ocupa o centro da coroa dental, circundada pela dentina, alojando a

polpa coronária, e seu formato depende da forma da coroa dental. O canal radicular se estende a partir raiz até o forame apical iniciando no término da câmara pulpar nos dentes portadores de um canal, e no assoalho da câmara pulpar nos dentes com mais de um canal. Ele pode ser dividido em canal dentinário e canal cementário, ambos unidos pelos vértices dando, geralmente, o formato de cones truncados, com o canal dentinário representando quase todo o ducto radicular e o canal cementário constituindo cerca de no mínimo meio milímetro de distância do forame apical. Existem vários tipos de canais, quais: canal principal, canal colateral, canal lateral, canal secundário, canal acessório, canal recorrente, canal interconduto, canal reticular, canal apical e canal cavo-interradicular (3). No ápice da raiz de um dente, por onde passam os nervos e os vasos sanguíneos que suprem a polpa dentária se abre o forame apical (4).

A polpa dentária é a estrutura mais interna do dente, sendo constituída de tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e innervado. Durante o período de desenvolvimento o papel da polpa é de promover nutrientes e líquido tecidual para os componentes orgânicos dos tecidos mineralizados circunjacentes. Além de exercer as funções nutritivas, a polpa também é responsável de executar função defensiva e sensorial (1).

O canal radicular é isolado da cavidade oral porque é revestido por uma coroa formada de esmalte e, na raiz, pelo cemento. Quando se há a quebra dessa camada protetora, a polpa fica exposta a agentes transgressores que criam alterações patológicas levando ao estado de necrose, sendo indicado neste caso o tratamento endodôntico, que tem como objetivo a remoção da polpa, dos microorganismos e da dentina infectada (3). Na fase final do tratamento, o canal é preenchido com uma obturação de material artificial, realizado por um preparo químico-mecânico. Objetivo desta etapa é selar todas as vias de entrada e saída de possíveis infiltrações para o interior dos canais radiculares, eliminando o espaço vazio que poderia ser infectado ou re-infectado pelos microorganismos presentes na cavidade oral. Este selamento é feito tridimensionalmente abrangendo os aspectos apical, lateral e coronário do sistema de canais radiculares. A obturação confina os micro-organismos residuais ao interior do canal, impedindo seu egresso aos tecidos perirradiculares (5).

1.2 Cimentos Obturadores Endodônticos

O cimento endodôntico é um material em estado plástico que auxilia na obturação do canal radicular, pois tem o objetivo de preencher e selar o espaço entre os cones de guta-percha e entre estes e as paredes dentinárias. As etapas do tratamento endodôntico consistem no preparo químico-mecânico, uso da medicação intracanal e obturação do sistema de canais radiculares. O cimento precisa de um alto grau de efetividade do efeito antimicrobiano, ação anti-inflamatória, boa tolerância tecidual e bom escoamento (5). Esse conjunto de atributos dos cimentos resulta em um sanar das patologias pulpares e periapicais (2).

1.2.1 Cimentos à base de Óxido de Zinco e Eugenol (OZE)

Um dos cimentos mais usados na odontologia é a base de óxido de zinco e eugenol, principalmente pela sua capacidade antibacteriana, baixa capacidade de adesão e baixo escoamento (5). A composição química do OZE se estabelece através da relação pó/líquido. A composição é formada por óxido de zinco, colofônia hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário e borato de sódio anidro; líquido eugenol, óleo de amêndoas e ácido acético glacial. Este cimento se apresenta como pó branco, levemente acinzentado e um líquido límpido, levemente amarelado, odor característico predominante do eugenol (óleo de cravo), isento de partículas em suspensão ou sedimentos (5). A preparação é realizada por mistura 1:1 (3 gotas de líquido, em placa de vidro estéril, incorporado gradativamente o pó até se obter uma mistura, onde um fio de 2 cm se rompe ao ser colocada uma espátula sobre a mistura). A consistência e escoamento dos cimentos proporcionam o preenchimento dos espaços entre a guta-percha e as paredes do canal, tanto quanto as ramificações do canal principal, no momento em que as técnicas adequadas são aplicadas. Durante a preparação precisa de cuidado enquanto a quantidade maior de líquido leva a um maior grau de citotoxicidade devido a presença de eugenol livre nos tecidos periapicais. Contudo, a maior quantidade de pó pode limitar a inserção e escoamento do cimento no sistema de canais radiculares.

1.2.2 Cimento à base de Resina epóxica

Um dos cimentos mais comuns a base de resina epóxica é o AH Plus, da classe das epoxiaminas (6). Ele consiste em uma base composta por éter de bisfenol, adiglicil, óxido de zircônia, tungsteanato de cálcio, aerosil e óxido de ferro e uma pasta catalisadora composta por

n,n-dibenzil-15 oxanonano-diamina-1,9 amina adamantana, ted-diamina, tungsteanato de cálcio, óxido de zircônio, acrosil e óleo de silicone(5) Comparado com os outros cimentos o AH Plus apresenta boas propriedades físicoquímicas de escoamento, proporcionando um maior embricamento com a dentina, radiopacidade, para um melhor selamento apical e insolubilidade aos tecidos. Por isso é apontado como padrão ouro. Referente ao desempenho de outros cimentos, sua infiltração e penetração intratubular é excepcional (14,15,16,17).

1.2.3 Óleos essenciais nos cimentos endodônticos

De 1999 a 2017 no Brasil foram realizados cerca de 70 milhões de tratamentos endodônticos, sendo os cimentos materiais indispensáveis para a vedação do canal em procedimentos de tratamento de canal (18). Para melhorar o desempenho deste material, a indústria busca inovação na criação de novos materiais que possam melhorar as propriedades físico químicas dos cimentos usados na prática clínica. Dentro das modificações cobijadas pelos pesquisadores um crescente interesse envolveu a incorporação em cimentos endodônticos de óleos essenciais, para desfrutar das propriedades benéficas destes compostos (7).

Os óleos essenciais são substâncias obtidas através da destilação de vegetais por métodos mecânicos e métodos físicos quando se trata de frutos do género Citrus. Sua formulação química dos óleos essenciais apresenta uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, mormente de monoterpenos, sesquiterpenos e de seus álcoois associados (7). Óleos essenciais, são caracterizados como aqueles que exclusivamente passam a tais processos e atendam às normas prerrogadas pela International Standard Organizationon Essentialoils, ISO 9235 (1997) da ISSO/ TC 54 e da Norma Portuguesa NP 90 (1987) do IPQ-CT 5 (12). O óleo essencial de melaleuca, tem seu princípio ativo o terpinen-4ol, que é um dos mais estudados quanto a atividade farmacológica, toxicidade, ação antimicrobiana e composição (8).

A melaleuca tem sido usada no tratamento de problemas cutâneos como infecções bacterianas e herpes simples (8). Ademais a ação germicida, expectorante, antisséptica, antivirótica, cicatrizante, antiacne, atividade em oncomicose, dermatite, eczema, odontalgia e halitose também têm sido demonstrados efetiva (9,10). Estudos mostram que em comparação com os antissépticos bucais, a presença do óleo essencial de Melaleuca diminuiu de forma expressiva o biofilme, o que pode reduzir o risco de pneumonia em pacientes de UTI, respirando por ventilação mecânica (11). As bactérias bucais são susceptíveis ao óleo de Melaleuca, sendo

rapidamente inativadas por ele, o que sugere que essa substância pode ser utilizada em produtos odontológicos e na manutenção da higiene bucal. A aplicabilidade desse óleo em casos de Endontia já tem sido posto em notas de pesquisa (13).

Após o adequado preparo químico mecânico sob abundante irrigação com soluções antissépticas, alguns microrganismos podem abrigar-se no interior do sistema de canais radiculares levando à manutenção da doença endodônticas. Contudo, escassos são os estudos dos efeitos que a combinação entre cimento e óleo de melaleuca apresentam na viabilidade das células que compõem o interior complexo dentino-pulpar. Por esta razão o objetivo deste trabalho é estudar a citotoxicidade de células humanas expostas a extratos de cimentos adicionados com diversas percentagens de melaleuca.

Por isso, este projeto visa avaliar a citotoxicidade em células humanas do óleo de Melaleuca adicionado aos cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e resinoso. As etapas para a realização do trabalho podem ser divididas como segue.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 Preparação de cimentos

Os ensaios foram realizados usando os cimentos Endofill e AH Plus. Os cimentos endodônticos foram manipulados segundo a recomendação do fabricante e a eles foi incorporado o óleo essencial de melaleuca, nas concentrações de 2% e 5%. A adição é baseada no peso inicial do cimento calculado usando uma balança analítica de precisão (Chyo JK-180, Chyo Balance Corp, Japão). Os cimentos são preparados de acordo com as instruções do fabricante e após medir seu peso inicial, o óleo essencial é acrescentado por adição (usando uma seringa) aos cimentos calculando 2% e 5%, respectivamente, do peso inicial do cimento. Deste modo, sucederam os subsequentes grupos: Endofill (EF), Endofill com melaleuca 2% (EF 2%), Endofill com melaleuca 5% (EF 5%), AH Plus (AH), AH Plus com melaleuca 2% (AH+2%), AH Plus com melaleuca 5% (AH+5%). Em seguida é realizado o acondicionamento dos preparados em moldes de silicone com 10mm de diâmetro e 1mm de altura e colocados na estufa a 37°C (simulando condição no interior do canal radicular) durante 24 horas. O Endofill e o AH Plus adicionados com melaleuca foram comparadas com suas formulações originais.

2.2 Realização dos extratos

Duas pastilhas de cimento foram esterilizadas sendo expostas durante 1 hora em cada lado aos raios UV e colocadas em um tubo falcon de 15 ml estéril. O cimento então foi pesado e ressuspense em uma concentração de 0,21g de cimento por ml de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM (PAA, Alemanha) suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

2.3 Cultura celular

Nesta pesquisa foram utilizadas as células do tipo hFB fibroblastos humanos primários. As células foram cultivadas em meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM (PAA, Alemanha) suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina a 37°C em uma estufa umidificada com de 5% CO₂.

2.4 Exposição aos cimentos

As células foram tripsinizadas com solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, solução de EDTA a 0,03%) e contadas através da câmara de Neubauer, sendo a viabilidade das células confirmadas através do corante Azul de Tripán na proporção 1:1 (meio com células e o corante). Após da contagem as células foram replaqueadas em uma densidade de 3x10⁴ células/cm². Após 24h as células foram expostas ao meio condicionado pelos cimentos puro ou nas diluições da melaleuca de 1:2, 1:4, 1:8, 1:60, 1:200 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram realizadas imagens em microscopia ótica representativas de cada condição.

2.5 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular após 24 horas de exposição aos extratos de cimentos foi avaliada pelo ensaio de MTT, um ensaio colorimétrico utilizando o composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarelada. A enzima responsável pela redução acima é a oxidorreductase celular dependente de NAD (P) H, que é existente em células viáveis. Além de que, a reação de redução sucede-se fora da célula pelo transporte de elétrons na

membrana plasmática. Uma solução estoque de 5mg/ml de MTT foi preparada em meio de cultivo, filtrada e congelada a -20°C. Para uma diluição 1:10 da solução estoque foi realizada para obter uma concentração no poço de 0,5 mg/ml de MTT. As células foram incubadas durante 4h na incubadora com atmosfera umidificada, 37°C, 5% CO₂. Após da incubação o meio foi retirado, e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO (50 µl/poço). A absorbância foi então medida a 570 e 690 nm (branco). O valor da absorbância de 570 nm foi subtraído ao valor da absorbância obtido a 690 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental.

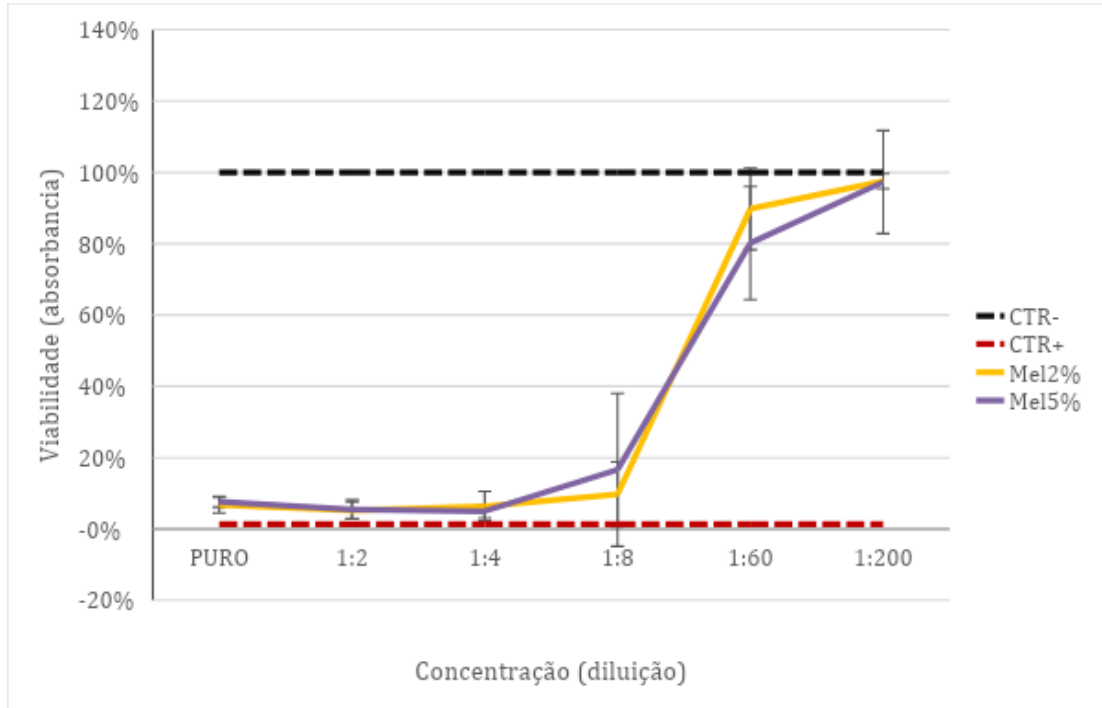
3 RESULTADOS

3.1 Ensaio de citotoxicidade

Esse ensaio foi realizado para verificar o nível de citotoxicidade dos cimentos endodônticos à base de óxido de zinco eugenol e resinoso (AH plus) em células de hFB fibroblastos humanos (3.525.362). A análise de viabilidade foi realizada pelo teste de MTT (Metiltetrazolio). Este teste de citotoxicidade colorimétrico utiliza o composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil brometo e de tetrazólio (MTT), de cor amarelada convertido em um composto roxo, o formazan, nas mitocôndria de células viáveis pelas enzimas responsável pela redução é a oxidoredutase celular dependente de NAD(P)H. Os valores de absorbância de cada tratamento foram comparados com os valores gerados pelo controle negativo (células vivas) e positivas (células mortas).

Para a realização do ensaio, os hFB fibroblastos humanos primários (N de parecer do CEP 3.525.362) foram expostos ao meio condicionado 24h por AH plus ou Endofill puro ou adicionado com 2% ou 5% de melaleuca. O meio foi colocado em contato com as células durante 24h puro e após diluição seriada de 1:2, 1:4, 1:8, 1:60, 1:200, tanto para o cimento puro quanto para o cimento adicionado com melaleuca. Além disso, o MTT foi realizado após exposição de fibroblastos à melaleuca 2% ou 5% pura ou diluída 1:2, 1:4, 1:8, 1:60, 1:200. Como mostrado na figura 1, tanto a melaleuca 2%, quanto a melaleuca 5 % mostraram uma alta toxicidade até a diluição de 1:60, com valores de viabilidade similares ao controle positivo (morte celular). Ao contrário as diluições de 1:60 e de 1:200 não mostraram citotoxicidade.

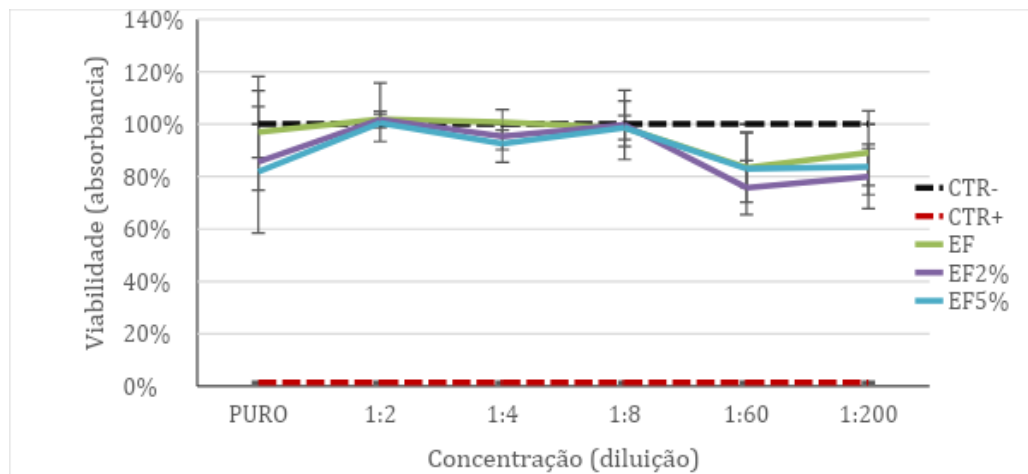
Figura 1. Viabilidade celular após exposição ao meio condicionado por melaleuca 2% e 5%.



Legenda: Absorbância relativa a fibroblastos expostos 24h ao meio condicionado por melaleuca 2% e 5%.

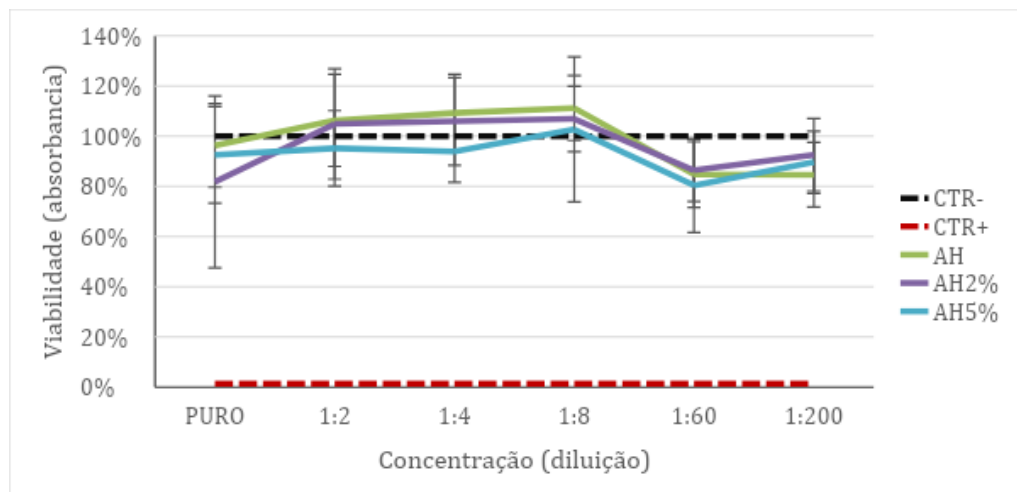
Os resultados de fibroblastos expostos 24h aos cimentos Endofill (gráfico 2) e AH plus (gráfico 3) puros ou adicionados com melaleuca 2% e 5% mostraram ausência de citotoxicidade celular em todas as diluições testadas.

Figura 2. Viabilidade celular após exposição ao meio condicionado por EF, EF2%, EF5%.



Legenda: Absorbância relativa a fibroblastos expostos 24h ao meio condicionado por cimento Endofill puro ou adicionado com melaleuca 2% e 5%.

Figura 3. Viabilidade celular após exposição ao meio condicionado por AH, AH2%, AH5%.



Legenda: Absorbância relativa a fibroblastos expostos 24h ao meio condicionado por cimento AH Plus puro ou adicionado com melaleuca 2% e 5%.

4 DISCUSSÃO

O objetivo deste projeto visa avaliar a citotoxicidade em células humanas do óleo essencial de Melaleuca adicionado aos cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e resinoso. No presente estudo, a viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, que é baseado na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais, presentes nas células vivas, em converter o sal amarelo tetrazólio para cristais de formazan lilás. (19,20). No vigente estudo os resultados nos mostraram que a melaleuca incorporada aos cimentos não é citotóxica nas concentrações testadas, contrariamente à melaleuca pura que mostrou citotoxicidade nas diluições menores, até 1:60. Esta diferença é devida provavelmente ao endurecimento dos cimentos, que faz com que a melaleuca ficaria presa nos cristais dos cimentos endodônticos, e que a liberação da melaleuca é menos concentrada no meio celular, quando comparada a sua forma líquida. Este fato resulta na ausência de toxicidade após a interação do cimento incorporado com óleo essencial de melaleuca com as células de fibroblastos.

Uma das perguntas levantadas quando se testa um material novo é se os óleos essenciais melhoram ou não o desempenho de uma característica clínica relevante dos cimentos endodônticos, que é a capacidade de escoamento, que garante que o cimento endodôntico adentre nos canais laterais e túbulos dentinários, estabelecendo uma obturação tridimensional. Essa especificidade assegura o sucesso da terapia endodôntica, devidos as suas propriedades físico-químicas e biológicas do material obturador, promovendo o reparo da área periapical e apical. O que é encontrado na literatura é que os resultados do escoamento do EF e AH Plus são divergentes. Trabalhos indicam uma melhora dessa propriedade no desempenho do cimento EF, enquanto o cimento resinoso apresentou um escoamento intermediário. Outros estudos demonstram que o AH Plus tem propriedades superiores ao EF, porém utilizam metodologia diferente para analisar o escoamento. Resultados prévios de colaboradores do grupo mostram que incorporação de 2% de melaleuca ao AH Plus melhora sua capacidade de escoamento, mas isso não acontece quando o óleo é incorporado no Endofill (dados não publicados). Então diante desses fatos se faz necessário termos mais estudos avaliando o comportamento de escoamento dos cimentos diante da incorporação dos óleos essenciais (26,27,28).

Assim como a melaleuca outros óleos essenciais são boas opções para a endodôntia como por exemplo óleo de cravo-da-índia, o eugenol e o acetato de eugenila, devido a sua ação antimicrobiana de amplo espectro contra microrganismos *gram*-positivos, *gram*-negativos, fungos e vírus. A melaleuca se mostra muito promissora em relação a sua capacidade antibacteriana, devido a sua composição química que é variada de terpenos (pineno, terpeno e cimeno), terpineol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol). Este conjunto de substâncias promovem ao produto uma ação antimicrobiana de amplo espectro, compreendendo as espécies *Gram* positivas e as *Gram* negativas. Outro ponto a se frisar é que os resultados da aplicação desse óleo demonstram atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e eficácia inclusive contra o *Enterococcus faecalis* (21,22). Essa bactéria é da espécie dos cocos, gram-positivo anaeróbico com adaptação a nutrientes ricos e baixos níveis de oxigênio, ecologia é complexa e com maior prevalência nos casos de re-tratamento de canal. Dentre os microorganismos oportunistas é um dos mais resistentes às medicações intracanaís e com maior capacidade de permanecer vivo nos túbulos dentinários, devido a sua surpreendente capacidade de sobreviver as condições ambientais não viáveis como baixo oxigênio, poucos nutrientes e variação da temperatura entre 10C° e 60C°, que os difere de outras espécies (23). Além disso este microorganismo é resistente a clorexidina, antibióticos e aos medicamentos utilizados no interior do SCR à base de hidróxido de cálcio, devido a presença de uma bomba de prótons que protege o citoplasma bacteriano do elevado pH destes produtos.

Essas evidências constata-se que o óleo essencial de melaleuca incorporados nos cimentos e sua liberação controlada pelo endurecimento dos mesmos, poderia ser capaz de ser uma excelente para o combate do microorganismo que está mais presente nos casos de reinfecção endodôntica, mas também estabelece uma menor possibilidade de retratamento endodôntico devida a reinfecção do canal. Por ser um composto químico de largo espectro, a melaleuca incorporada nos cimentos poderia combater de maneira ampla os outros microorganismos presentes no canal radicular, tanto *gram* positivos tanto *gram* negativos, e particularmente o *Enterococcus faecalis*, promovendo também um tratamento endodôntico mais eficaz, seguro e completo, sem toxicidade para os tecidos (24,25).

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de melaleuca incorporado ao Endofill e o AH Plus nas concentrações de 2% e 5% não foram tóxicos para as células de fibroblastos primários após 24 horas de exposição. A melaleuca pura, 2% e 5% mostraram uma alta toxicidade até a diluição de 1:8, com valores de viabilidade similares ao controle positivo (morte celular). Já as diluições de 1:60 e de 1:200 não mostraram citotoxicidade. Por isso, a melaleuca pode-se ser considerada como uma opção promissora e relevante, e que por não ser de caráter citotóxica, não ocasionaria dano ao tecido, mas resultaria na potencialização no tratamento para desinfecções dos canais radiculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siqueira JFJR, Lopes HP, editors. Endodontia biologia e técnica Elsevier. 4º ed. Vol 15º. Rio de Janeiro: Atlas; 2015.
2. Siqueira JFJR, Lopes HP, editors. Endodontia biologia e técnica Elsevier. 4º ed. Vol 15º. Rio de Janeiro: Atlas; 2015.

3. LEMOS, Érico de Mello. Endodontia. São Paulo: Endodontia Eletrônica, 2020. Disponível em: <http://www.endoe.com/images/Anato_Interna/anato_interna_1.html>. Acesso em: 21 set.2020.
4. PECORÁ, Jesus Djalma. São Paulo: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto São Paulo, Endodontia, 2020. Disponível em:<<http://www.forp.usp.br/restauradora/infopac.htm>> Acesso em: 21Set. 2020.
5. Siqueira JFJR, Rôças IN, Lopes HP. Biological principles of endodontic treatment of teeth with pulp necrosis and apical lesions. 2011,06, 10(69) 8-14.
6. ÖZKÖMÜR A. Effect of calcium hypochlorite on the bond strength of the AH Plus sealer to dentin.[trabalho conclusão de curso]. Rio Grande do Sul: Universidade federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Odontologia; 2016.
7. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. 2002, 2, 6; 46(6):1914-1920.
8. Monteiro MHDA, Macedo HW, Junior AS, Paumgartten FJR. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de Melaleuca L. (Myrtaceae Juss). 2013, 9,1; 8(1):19-32.
9. Cordeiro JMP, Lubi N. Utilização do óleo essencial de melaleuca alternifolia como coadjuvante no tratamento da onicomicose. [trabalho de conclusão de curso] Paraná: Universidade Tuiuti do Paraná; 2017.
10. Fontana A. Eficácia do óleo de Melaleuca alternifolia sobre bactérias cariogênicas e suacitotoxicidade sobre cultura de queratinócitos. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia de Araraquara. Universidade Estadual Paulista; 2011.
11. Cabral DB. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre Candida spp com aplicabilidade em tubos traqueais. [tese de Doutorado em Enfermagem] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.
12. Cunha P. Cavaleiro C. Fármacos Aromáticos e óleos essenciais. Fundação Calouste Gulbenkian. Farmacognosia e Fitoquímica. 2010; p (670): 55-62.

13. Gioppo A, Bellaver EH, Zancanaro V. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. 2019, 06, 26; 32(3): 35-42.
14. Lisbôa EI, Neto UXS, Carneiro E, Fariunuk LF, Westphalen.VPD. Capacidade de selamento e penetração intratubular do MTA Fillapex e do AH Plus em dentes humanos. 2017, 01, 09; 46(1):7-13.
15. MalkaVB. Radiopacidade em cimentos endodônticos: Comparação em dois métodos in vitro.[trabalho de conclusão de curso].Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
16. Baldissera RS. Avaliação da penetrabilidade apical dos cimentos AHPLUS e MTA Fillapex por meio da microscopia confocal. [dissertação especialização]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal Rio Grande do Sul; 2013.
17. Sydney GB, Ferreira M, Deonísio MD, Leonardi DP, Batista A. Analysis og the flow profile of six endodontic cements. 2008,11, 3; 57(1): 7-11.
18. Chisini LA, Martin ASS, Pires ALC, Noronha TG, Demarco FF, Conde MCM, Correa MB. Estudo de 19 anos dos procedimentos odontológicos realizados no Sistema Único de Saúde brasileiro. 2019, 01, 03; 27(3): 345-353.
19. Fernanda Cunha Marins,Carina Taboada Ronconi,Flávia Medeiros Saavedra, Ana Beatriz Machado Lima, Alexandre Augusto Zaia, Edson Jorge Lima Moreira,Emmanuel João Nogueira Leal da Silva1. Cytotoxicity evaluation of two MTA-based root canal sealers: an in vitro study. Rev. Bras. Odontol., Rio de Janeiro, v. 74, n. 1, p. 27-30, jan./mar. 2017.
20. Silva EJ, Zaia AA, Peters OA. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. Clin Oral Investig. In press 2016.) (Silva EJ, Neves AA, De-Deus G, Accorsi-Mendonça T, Moraes AP, Valentim RM, et al. Cytotoxicity and gelatinolytic activity of a new silicon-based endodontic sealer. J Appl Biomater Funct Mater. 2015;13(4):e376-80.

21. Marins,F.C;Ronconi,C.T;Saavedra,F.M;Lima,A.B.M.Zaia,A.A;Moreira,E.J.L;Silva,E.J.N. L. Cytotoxicity evaluation of two MTA-based root canal sealers: an in vitro study.Rev. Bras. Odontol., v. 74(1), p. 27-30, 2018.
22. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. Ilaria Prada, Pedro Micó-Muñoz , Teresa Giner-Lluesma, Pablo Micó-Martínez , Nicolás Collado-Castellano, Alberto Manzano-Saiz . Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019 May 1;24 (3):e364-72.
23. Avaliação da eficácia antimicrobiana de selantes de canal radicular contra *Enterococcus faecalis*: um estudo comparativo. Suraj Arora 1, Shugufta Mir 2, Ashesh Gautam 3, Renu Batra 4, Sarmeshta Soni 3, Kamini Lata. 01 de junho de 2018; 19 (6): 680-683.
24. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de alecrim, citronela, eucalipto e melaleuca contra *enterococcus faecalis*. Anais do 58º Congresso brasileiro de química; 2018 Nov 6-9; Rio de Janeiro, Brasil, Rio de Janeiro: Paulo Freire; 2018.
25. A influência de *Enterococcus faecalis* como patógeno do canal radicular dentário no tratamento endodôntico: uma revisão sistemática. Faisal Alghamdi, Marwa Shakir. 13 de março de 2020; 12 (3): e7257. doi: 10.7759 / cureus.7257.
26. Rocha, B.C.S.; Limoeiro,A.G.S;Bueno,C.E.S.;Souza,F.S;Brait, A.H. Estudo in vitro do nível de escoamento de cinco cimentos endodônticos: Endofill, AH Plus, MTA Fillapex, Sealer 26 e Pulp Canal Sealer EWT.JDental Press Endodontics,v.7,p67-71,2017.
27. Corá,G.M;Zardo,L;Vieira,R.V;Bruzza,A;Paulos,M, evaluation of draining difference film thickness of four endodontic cements.Revista Odontológica de Araçatuba, v.40,(1), p. 09-12,2019.
28. Ribeiro LM. Propriedades físicas, químicas e biológicas de cimentos endodônticos modificados pela melaleuca [dissertação]. Duque de Caxias (RJ): Unigranrio; 2020.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY - UNIGRANRIO 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS BIOMATERIAIS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS HUMANAS DE OSSO E PELE								
Pesquisador: Sara Gemini Piperni								
Área Temática:								
Versão: 1								
CAAE: 16124819.6.0000.5283								
Instituição Proponente: ASSOCIACAO FLUMINENSE DE EDUCACAO								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 3.525.362								
Apresentação do Projeto: O presente estudo avaliará a interação de superfícies ou partículas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada em várias temperaturas, dióxido de titânio e L-PRF, com células de pele e osteoblastos em termos de citotoxicidade, diferenciação e produção de matriz extracelular com o intuito de aprimorar o uso destes biomateriais destinados à prática clínica. As células que farão parte do estudo serão obtidas de cultura primária de material de biópsia coletada durante procedimento odontológico de rotina. Amostras de sangue periférico e de tecido ósseo serão obtidas de 20 voluntários que concordarem com o protocolo do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que explica os objetivos, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo. A seleção dos participantes obedecerá a critérios de inclusão (indivíduos maiores de 18 anos e não fumantes) e de exclusão (portadores de qualquer doença sistêmica ou usuários de medicação de uso controlado). As células isoladas serão empregadas em experimentos in vitro, que incluem: caracterização dos materiais; análise de citotoxicidade; de adesão celular; análise multiplex de produtos secretados; de tráfego intracelular; coloração de TRAcP e ALP; de produção de colágeno da matriz								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160</td> <td style="border: none;">CEP: 25.071-202</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: 25 de Agosto</td> <td style="border: none;">Município: DUQUE DE CAXIAS</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: RJ</td> <td style="border: none;">E-mail: cep@unigranrio.com.br</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (21)2672-7733</td> <td style="border: none;">Fax: (21)2672-7733</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160	CEP: 25.071-202	Bairro: 25 de Agosto	Município: DUQUE DE CAXIAS	UF: RJ	E-mail: cep@unigranrio.com.br	Telefone: (21)2672-7733	Fax: (21)2672-7733
Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160	CEP: 25.071-202							
Bairro: 25 de Agosto	Município: DUQUE DE CAXIAS							
UF: RJ	E-mail: cep@unigranrio.com.br							
Telefone: (21)2672-7733	Fax: (21)2672-7733							

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.525.362

orgânica e mineralizada; e ensaio de reabsorção. Os resultados dos diferentes experimentos serão analisados comparando-se os efeitos dos diferentes biomateriais sobre as células testadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente estudo visa compreender a citotoxicidade ao expor células humanas de pele ou osso em cultivo, às superfícies ou partículas nanoestruturadas de hidroxiapatita carbonatada, látex, L-PRF ou dióxido de titânio com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Objetivo Secundário:

O presente estudo visa compreender a biocompatibilidade ao expor células humanas de pele ou osso em cultivo, às superfícies ou partículas nanoestruturadas de hidroxiapatita carbonatada, látex, L-PRF ou dióxido de titânio com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para coleta de sangue são mínimos. Não há riscos na coleta dos restos cirúrgicos pois estes serão aproveitados partindo do material de descarte de cirurgia, não apresentando riscos para o paciente.

Benefícios:

As aplicações de biomateriais (superfícies ou materiais nanoestruturados) abrangem uma grande diversidade de áreas tais como a terapia de câncer, cardiovascular, ortopedia e odontologia, doenças infecciosas, gastroenterologia, imunologia, neurologia, além de preenchedor, cosméticos e fotoprotetores (Alizadeh-Osgouei, Li, and Wen 2019). Os resultados deste estudo serão usados com o intuito de aprimorar o uso dos biomateriais testados tanto na prática clínica quanto na medicina estética.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.525.362

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desfecho Primário:

O desfecho primário do presente estudo é a avaliação da citotoxicidade ao expor células humanas de pele ou osso em cultivo, às superfícies ou partículas nanoestruturadas de dióxido de titânio ou hidroxiapatita com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Desfecho Secundário:

Na hipótese de que os materiais testados não provoquem a morte celular, o desfecho secundário do presente estudo será a avaliação do potencial bio-estimulador das superfícies ou partículas nanoestruturadas de dióxido de titânio ou hidroxiapatita para células humanas de pele ou osso em cultivo, com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos estão de acordo.

Recomendações:

Que os resultados da pesquisa sejam publicados e divulgados as instituições de pesquisa do país.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os documentos solicitados foram readequados e apresentados da forma correta. Portanto não existem mais inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 04 de julho de 2019. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa será necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.525.362

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Cronograma	cronograma_atualizado_Sara.pdf	14/08/2019 09:41:38	Renato Cerqueira Zambrotti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_atualizado_Sara.pdf	14/08/2019 09:41:14	Renato Cerqueira Zambrotti	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_1356212.pdf	12/06/2019 18:17:56		Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	12/06/2019 18:16:29	Sara Gemini Piperni	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_Funadesp_Sar a_Gemini_Piperni.pdf	12/06/2019 18:09:39	Sara Gemini Piperni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_clinica.pdf	11/06/2019 08:53:10	Sara Gemini Piperni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia.pdf	11/06/2019 08:52:48	Sara Gemini Piperni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	10/06/2019 12:52:18	Sara Gemini Piperni	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	17/05/2019 08:14:17	Sara Gemini Piperni	Aceito
Orçamento	Orcamento_de_Projeto_2019_para_CE P.pdf	14/05/2019 14:41:23	Sara Gemini Piperni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UNIGRANRIO.pdf	14/05/2019 14:31:02	Sara Gemini Piperni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 22 de Agosto de 2019

Assinado por:
Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br