

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



LIVANEA MACHADO RIBEIRO

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS
DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS MODIFICADOS PELA
MELALEUCA**

Duque de Caxias

2020

LIVANEA MACHADO RIBEIRO

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS MODIFICADOS PELA MELALEUCA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional da Universidade
José de Souza Herdy, como quesito para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biomédicas.

Duque de Caxias

2020

Livanea Machado Ribeiro

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS MODIFICADOS PELA MELALEUCA**

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy” UNIGRANRIO para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 28 de agosto de 2020.

Banca Examinadora

Sara Gemini Piperni

Prof.^a Dr.^a Sara Gemini Piperni
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Henrique dos Santos Antunes
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

Andrea Fagundes Campello

Prof.^a Dr.^a Andrea Fagundes Campello
Universidade Iguazu – UNIG

Dedico o meu trabalho a A Deus, por me abençoar com saúde nesta direção. A Ti elevo a minha alma com toda a toda minha gratidão.

Aos meus pais, Léa e Ivan, por serem meu exemplo e maiores apoiadores.

Aos meus filhos João Vitor, Mariana e Rafael por serem pacientes, amigos, incentivadores e me amarem incondicionalmente.

Ao meu marido Elias, por todo o incentivo moral.

A todos os professores, amigos e familiares que de alguma forma me ajudaram e me deram suporte para que eu pudesse prosseguir.

R484pRibeiro, Livanea Machado.

Propriedades físicas, químicas e biológicas de cimentos endodônticos modificados pela melaleuca/ Livanea Machado Ribeiro. – Duque de Caxias, 2020.

57f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional)–Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2020.

“Orientadores:Prof.^a Dra.Sabrina de Castro Brasil
Prof. Dr. Victor Talarico Leal Vieira”.

Referências: f. 35-45.

1. Biomedicina. 2.Odontologia. 3. Endodontia. 4. Óleo de melaleuca.5. Citotoxicidade. I. Brasil, Sabrina de Castro.II.Vieira, Victor Talarico Leal. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”.IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor Edson Jorge, Professora Sabrina e Professor Victor que gentilmente me receberam, apoiaram o meu amadurecimento, e por toda paciência e compreensão, a minha admiração, respeito e gratidão.

A UNIGRANRIO, que sempre esteve em toda minha formação.

Ao INMETRO E A UEZO pelo gentil acolhimento.

Ao BIOTRANS, pela equipe maravilhosa e dedicada e comprometida em deixar o seu melhor, que em muito contribuiu na minha formação pessoal e profissional, em especial às Professoras Carina, Professora Marlene, Professora Cláudia e Professor Rômulo a minha gratidão, respeito e admiração.

Aos amigos que estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando neste projeto Ana Beatriz, Daniela, Elisângela, Nathalia, Alan, Marjorie, Santrine, Monique, Renata, Elinéia por toda atenção e ajuda. Foi maravilhoso o convívio, ensinamentos, e momentos juntos. Gratidão.

A todos os funcionários que de alguma forma me colaboraram para realização deste projeto.

RESUMO

O cimento obturador endodôntico tem o objetivo de vedar tridimensionalmente o sistema de canais radiculares após o preparo químico-mecânico e promover proteção dos tecidos perirradiculares. Propriedades físico-químicas e biológicas dos cimentos tem sido investigadas na busca por um material obturador que apresente efeito antimicrobiano, ação anti-inflamatória, boa tolerância tecidual e bom escoamento, desempenhando, assim, um efeito estimulador que contribua no processo de reparo das patologias pulpares e periapicais. A eficácia da incorporação do óleo essencial de Melaleuca em produtos de uso odontológico tem sido comprovada pelo seu potencial antimicrobiano e no controle da inflamação. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar o impacto da adição do óleo essencial de Melaleuca na citotoxicidade e no escoamento dos cimentos endodônticos Endofill® (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça), AH PLUS® (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) analisados em sua formulação original e após a adição do óleo essencial de melaleuca nas concentrações de 2% e 5% de sua composição. Foram estabelecidos os 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%). A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-1 através do ensaio de MTT para verificar a viabilidade celular. O ensaio de escoamento foi realizado em triplicata de acordo com a ISO 6876 e em cada grupo os cimentos foram manipulados e depositados sobre uma placa de vidro e uma placa com um peso adicional de 120 g foi colocada sobre o material por 10 minutos. Com auxílio de um paquímetro digital, foram medidos os diâmetros maiores e menores dos cimentos e uma média aritmética foi obtida. Os resultados demonstraram que a citotoxicidade dos cimentos EF e AH+ não foi alterada com a adição do óleo essencial de Melaleuca ($p>0,05$). O acréscimo da melaleuca no cimento EF diminuiu o escoamento ($p<0,05$), não havendo diferença estatística no efeito deletério para as adições de 2% ou de 5% ($p>0,05$). O cimento AH+ apresentou um escoamento inferior ao cimento EF ($p<0,05$), porém com a adição de 2% de melaleuca promoveu aumento do escoamento ($p<0,05$). Foi possível concluir que O AHPLUS modificado pelo óleo essencial de Melaleuca a 2% demonstrou melhora na sua propriedade de escoamento e que a citotoxicidade dos cimentos não foi alterada pela adição do óleo essencial de melaleuca.

Palavras-chave:Endodontia, óleo essencial de melaleuca, cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol

ABSTRACT

The endodontic shutter cement aims to seal the root canal system three-dimensionally after chemical-mechanical preparation and promote protection of periradicular tissues. Physicochemical and biological properties of cements have been investigated in the search for a obturator material that presents antimicrobial effect, anti-inflammatory action, good tissue tolerance and good flow, thus performing a stimulating effect that contributes to the repair process of pulp and periapic pathologies. The effectiveness of the incorporation of Melaleuca essential oil in dental products has been proven by its antimicrobial potential and in the control of inflammation. Thus, the aim of the present study is to evaluate the impact of the addition of Melaleuca essential oil on cytotoxicity and the flow of Endofill® (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça), AH PLUS (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) endodontic cements analyzed in its original formulation and after the addition of melaleuca essential oil at concentrations of 2% and 5% of its composition. The Endofill (Pe), Endofill with melaleuca 2% (EF 2), Endofill with melaleuca 5% (Pe 5%) AH PLUS (AH+), AH PLUS with melaleuca 2% (AH+2%), AH PLUS with melaleuca 5% (AH+5%). The cytotoxicity evaluation was performed according to ISO 10993-1 through the MTT assay to verify cell viability. The runoff test was carried out in triplicate according to ISO 6876 and in each group the cements were manipulated and deposited on a glass plate and a plate with an additional weight of 120 g was placed on the material for 10 minutes. With the aid of a digital caliper, the largest and smallest diameters of the cements were measured and an arithmetic mean was obtained. The results showed that the cytotoxicity of EF and AH+ cements was not altered with the addition of Melaleuca essential oil ($p > 0.05$). The increase of melaleuca in ef cement decreased the flow ($p < 0.05$), with no statistical difference in the deleterious effect for the additions of 2% or 5% ($p > 0.05$). The AH+ cement presented a lower yield than the EF cement ($p < 0.05$), but with the addition of 2% of melaleuca promoted an increase in the flow ($p < 0.05$). It was possible to conclude that THE AHPLUS modified by the essential oil of Melaleuca at 2% showed improvement in its yield ing property and that the cytotoxicity of the cements was not altered by the addition of melaleuca essential oil.

Keywords: Endodontics, tea tree essential oil, endodontic cement based on zinc oxide and eugenol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC® *American Type Culture Collection*

BHI Brain heart infusion

DMEM Meio mínimo essencial modificado de Dulbecco

DMSO Dimetilsulfóxido

FDA Food and Drug administration

M1 Subtipo macrófago1

M2 Subtipo macrófago2

μL Microlitros

MTT Reagente Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

SCR Sistema de canais radiculares

OMS Organização mundial de saúde

OZE Óxido de Zinco e eugenol

PCR Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1. A infecção endodôntica.....	11
1.2.Cimentos obturadores endodônticos.....	13
1.2.1 Cimento à base de óxido de zinco e eugenol.....	14
1.2.2Cimento à base de resina epóxica.....	14
1.3Óleos essenciais.....	15
1.4Óleo essencial de melaleuca	15
1.4.1 Atividade antimicrobiana da melaleuca	18
1.5 A utilização da melaleuca na Odontologia	18
2.JUSTIFICATIVA.....	21
3.OBJETIVOS.....	22
4.MATERIAISE MÉTODOS.....	23
4.1 Confeção do corpo de prova.....	23
4.2 Ensaio de escoamento.....	24
4.3 Ensaio de citotoxicidade.....	25
4.3.1 Cultura celular.....	25
4.3.2 Citotoxicidadecimentos puros emodificados.....	25
5.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
6.RESULTADOS	28
7.DISSCUSSÃO.....	31
8.CONCLUSÃO.....	34
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
10.ANEXOS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1A Infecção Endodôntica

O equilíbrio da microbiota oral é essencial para o indivíduo, considerando seu possível impacto na saúde sistêmica e a relação mútua com cardiopatias, diabetes, partos prematuros, câncer oral, esofágico, pancreático (BEARFIELD et al., 2002; SEYMOUR, 2007; YU G, 2014; GERMANO et al., 2018). A necessidade de tratamento endodôntico está associada a alguns fatores, contudo, o fator microbiano tem sido apontado como mais comum (SIQUEIRA et al., 2012). Na ecologia bucal são estabelecidas complexas interações entre microrganismos e o hospedeiro, e na desarmonia deste relacionamento ocorre o desenvolvimento de doenças como a cárie que, ao evoluir, atinge o sistema de canais radiculares (SCR), deflagrando infecções endodônticas (MUKHERJEE, et al 2014).

Neste cenário, cerca de 400 diferentes espécies tem sido identificadas através de técnicas avançadas em biologia molecular, que tem revelado maior prevalência de bactérias anaeróbias estritas e bactérias do filo Fusobacterium, mais comumente identificadas em abscessos apicais, *flare-up*, onde ocorre a permanência de microrganismos resistentes a terapia endodôntica, e na presença de reagudizações (SIQUEIRA et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2012; CHAVEZ DE PAZ, 2002).

A espécie de maior prevalência nos casos que necessitam de retratamento é o *Enterococcus faecalis*, que é considerado o microrganismo mais resistente às medicações e com maior habilidade de permanecer vivo nos túbulos dentinários em ambientes desfavoráveis, reinfectando um dente já tratado (LOVE, 2001; PINHEIRO et al., 2003a). Dada a sua extraordinária capacidade de se adaptar às severas condições ambientais, estes microrganismos possuem estratégias de crescimento e sobrevivência que os diferenciam das outras espécies, como comprovado em estudo *in vitro* que evidencia a capacidade do microrganismo de assumir o estado de “viável, mas não cultivável”, quando expostas a ambientes estressantes (NACIF et al., 2010). Estes cocos Gram-positivos são nutridos nos sistemas de canais radiculares por substratos presentes nos fluidos dos tecidos conjuntivos subjacentes ao osso alveolar, ligamento periodontal e estão associados a dentes com situações clínicas

de edema, dor, fístula e drenagem de secreção purulenta intracanal (ANDRADE et al., 2011). Além disso, são resistentes 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 (NACIF, 2010).

A microscopia eletrônica de varredura e metodologias de análise molecular como a reação em cadeia de polimerase (PCR) são de grande valia não só no reconhecimento de espécies envolvidas, mas também na identificação de novas espécies de fungos, bem como no reconhecimento clonal (PETERS et al., 1995; KALFAS et al., 2001; MORAES et al., 2002).

Uma vez estabelecida a infecção de origem endodôntica, faz-se necessário o tratamento, e a tomada de decisão deve ser embasada no diagnóstico preciso e no estabelecimento de um protocolo que promova a eliminação bacteriana a fim de atingir o controle de infecção (BONJARDIM et al., 2019).

As etapas do tratamento endodôntico consistem no preparo químico-mecânico, uso da medicação intracanal e obturação do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA, et al., 2012). Cada etapa deve ser realizada com materiais que apresentem características e propriedades que colaborem para o sucesso do tratamento, como a ação antimicrobiana presente nos cimentos utilizados na obturação do SCR (COHEN, 2000).

A desinfecção do SCR não garante a completa remoção dos microrganismos causadores da infecção pulpar e periapical. Bactérias sobrevivem aos efeitos do preparo químico-mecânico em cerca de 40 a 60% dos casos, independentemente da solução irrigadora ou da concentração empregada (SIQUEIRA 2012). Assim, a obturação tridimensional de um canal previamente contaminado atua mecanicamente inviabilizando espaços para o crescimento de microrganismos e, quimicamente, sobre os microrganismos remanescentes no canal radicular. No entanto, esta ação é limitada. Estudos histológicos mostram bactérias viáveis mesmo quando em contato com o material obturador. O selamento apical, lateral e coronário adequado é um parâmetro técnico que, se atingido, favorece o reparo dos tecidos perirradiculares (COHEN, 2000). O emprego de um cimento com boas propriedades biológicas e físico-químicas é fundamental para o êxito do tratamento endodôntico (MARTIN, 2014).

1.2 Cimentos Obturadores Endodônticos

O principal papel do cimento na massa obturadora é preencher os espaços deixados entre a guta-percha e as paredes do canal, além de promover a adesão da guta percha as paredes. Para cumprir esse papel o cimento precisa apresentar propriedades biológicas e físico-químicas adequadas. O cimento endodôntico ideal: não deve ser irritante aos tecidos periapicais; deve ter qualidades antissépticas permanentes; ser de fácil introdução no canal; ser biocompatível; não deve descolorir as estruturas dentais; não deve ser poroso e deve manter-se estável dimensionalmente ; deve ser de fácil remoção se necessário for; obturar tridimensionalmente os túbulos dentinários e o forame apical contra a invasão bacteriana; deve ser radiopaco; apresentar boa adesão com as paredes do canal radicular e preferencialmente, ser bactericida ou, no mínimo, bacteriostático (Lopes & Siqueira, 2015). No entanto, BOUILLAGUET *et al.* 2004, ao avaliarem o comportamento dos diferentes cimentos endodônticos verificaram que todos os cimentos apresentam significantes limitações, vantagens e desvantagens físico química e biologicamente falando.

O escoamento é a capacidade de um cimento endodôntico de penetrar nos túbulos destinatários e canais laterais, favorecendo uma obturação tridimensional. As propriedades físico químicas e biológicas do material obturador impactam de forma relevante no sucesso da terapia endodôntica, visando promover o reparo da região apical e periapical (Candeiro, 2012). A sua adesão as paredes dentinárias, por exemplo, é crucial para o controle da percolação apical, tornando favorável o bom escoamento do cimento, e uma obturação hermética do SCR (De-Deus, 2002). Mendonça, 2018 destaca a importância do bom escoamento e boa adesividade do cimento, uma vez que, na porção apical, os túbulos dentinários são menos densos e adesão do cimento nesta região pode ser comprometida.

A complexa anatomia do SCR requer bom escoamento do cimento permitindo a penetração do cimento em irregularidades, reentrâncias e sulcos do SCR. Contudo é válido ressaltar esta fluidez não pode exceder a ponto de extravasar e causar danos aos tecidos periapicais (Corá, 2019).

Atualmente os cimentos endodônticos são comercialmente disponíveis em diferentes formulações. São classificados em cimentos à base de óxido de zinco e

eugenol, a base de hidróxido de cálcio, resinosos, biocerâmicos, ionômero de vidro e à base de silicone (LOPES e SIQUEIRA, 2015).

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

A formulação mais comum para um cimento à base de oze, Endofill(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) consiste em pó – 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. É constituído por um 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.(LOPES & Siqueira Jr,2015)

Suas propriedades dependem fortemente da relação pó/líquido. Maior quantidade de líquido o torna citotóxico, pela presença de eugenol livre nos tecidos periapicais. Por outro lado, maior quantidade de pó dificulta sua inserção e escoamento no sistema de canais radiculares (COHEN e BURNS,2000).Quando comparado a outros cimentos, o cimento OZE sem aditivos apresenta baixa capacidade de adesão e baixo escoamento (LOPES & SIQUEIRA, 2015).A consistência e escoamento dos cimentos possibilitam o preenchimento dos espaços entre a guta-percha e as paredes do canal, assim como as ramificações do canal principal, quando técnicas adequadas são empregadas.(LOPES & Siqueira Jr,2015).A proporção é geralmente de(1:1),ou seja,3 gotas de líquido em placa de vidro estéril sendo 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(DentsplySirona).

1.2.2 Cimento à base de Resina Epóxica

O AH PLUS® (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça)é um cimento à base de resina do tipo epóxi-aminas que está disponível no mercado desde 1996 (ÖZKÖMÜR,2018). Sua apresentação comercial consiste em uma pasta 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-5-

oxanonano-diamina-1,9, amina adamantana, tcd-diamnina, tungsteanato de cálcio, óxido de zircônio,aerosil e óleo de silicone (LOPES & SIQUEIRA 2015).

É um cimento considerado padrão ouro por suas excelentes propriedades físico químicas de: escoamento,que proporciona ummaior embricamento com a dentina;radiopacidade; bom selamento apical; e insolubilidade aos tecidos .Por isto o mesmo é referência em muitas pesquisas. A infiltração e penetração intratubular é superior quando comparados a performance de outros cimentos (LISBOA,2017; MALKA, 2012; BALDISSERA,2013; ARRUDA *et al.*,2005 SIDNEY *et al.*,2008; CECHELA *et al.* 2014).

1.3 Óleos Essenciais

A natureza e sua riqueza em diversidade é fonte de diversos recursos medicamentosos e os produtos naturais ainda são considerados as principais fontes de novas moléculas para a fabricação de diversos medicamentos (BALOUIRI,*et al* 2016).

Os óleos essenciais são substâncias obtidas através da destilação devegetais por métodos mecânicos e métodos físicos quando se trata de frutos do género Citrus (BUCHBAUER E BASER, 2010). São considerados óleos essenciais aqueles exclusivamente submetidos a tais processos e atendam às normas estabelecidas pela *International Standard Organization on Essentialoils*, ISO 9235 (1997) da ISSO/ TC 54 e da Norma Portuguesa NP 90 (1987) do IPQ-CT 5 (CUNHA, *et al.*, 2009).

A composição química dos óleos essenciais é complexa e apresenta uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e de seus álcoois associados (ANDRADE *et al.*, 2003; CARSON *et al.*, 2006).

1.4 Óleo Essencial de Melaleuca

A Melaleuca Alternifolia é um vegetal que pertence à família das mirtáceas e possui 130 gêneros, dentre eles os conhecidos eucalipto e cravo. O género Melaleuca compreende aproximadamente 200 espécies, todas nativas da Austrália.

A árvore de chá (*teatree*) pode chegar a 6 metros de altura, porém seu crescimento é muito lento e pode viver por anos na forma de arbusto (BALOUIRI, *et al* 2016).

O óleo de Melaleuca em sua composição pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpeno e cimeno), terpineol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol (SAWAYA *et al.*, 2002; SIMÕES *et al.*, 2002). Tais substâncias conferem ao produto atividade antimicrobiana de amplo espectro, que compreende tanto as espécies gram positivas quanto as gram negativas, além de atividade antifúngica potente. Em relação à sua dosagem no processo de fabricação, a composição do óleo de Melaleuca é regulamentada pela norma ISO 4730 que determina que o terpineol deve estar presente em 30 a 40% do conteúdo e o cineol em 15% ou menos (MARTINS *et al.*, 2010).

É válido ressaltar que a estabilidade e ação do óleo de Melaleuca podem ser afetadas por influências em sua composição por diversos fatores, dentre eles o tempo de armazenamento, presença de luz, calor, exposição ao ar e umidade (CARSON *et al.*, 2006).

Cosmeticamente, o óleo de Melaleuca pode ser incorporado em cremes, loções, sabonetes e xampus antissépticos, em produtos para a limpeza da pele oleosa, removedores de maquiagem, pós-depilatórios, desodorantes, em xampus e loções para cabelos oleosos e/ ou caspa.

O princípio ativo do óleo essencial de Melaleuca é o terpinen-4-ol, que é um dos mais estudados quanto a atividade farmacológica, toxicidade, ação antimicrobiana e composição. A Melaleuca tem sido usada no tratamento de problemas cutâneos como infecções bacterianas e herpes simples (Monteiro, 2013). Além disso, a ação germicida, expectorante, antisséptica, antivirótica, cicatrizante, antiacne, atividade em oncomiçose, dermatite, eczema, odontalgia e halitose também tem sido demonstrada (CORDEIRO, 2014; FONTANA, 2015).

Calcabrini *et al.*, (2004) analisaram o potencial da atividade antitumoral do óleo complexo de melaleuca e seu princípio ativo destilado contra células M14 WT de melanoma humano e suas contrapartes resistentes a medicamentos e os resultados demonstraram que o terpinen-4-ol foi capaz de prejudicar o crescimento das células de melanoma M14 humanas além da superexpressão de glicoproteína P na membrana plasmática, superando a resistência a apoptose dependente de caspase exercida por células tumorais positivas para glicoproteína-P.

1.4.1 Atividade antimicrobiana da Melaleuca

O potencial medicinal dos óleos essenciais tem sido amplamente estudado ao longo dos anos, e os resultados demonstram potencial atividade antimicrobiana, antifúngica, ação anticancerígena, analgésica, anti-inflamatória e eficácia inclusive contra o *Enterococcus faecalis* (American Type Culture Collection ATCC 29212). (LINDLEY et al., 1998; ZENG et al., 2011 MOREIRA, et al 2018).

O potencial efeito antimicrobiano de óleos essenciais como timol, carvacrol, eugenol, linalol e geraniol tem sido demonstrado por estar associado à presença de pequenas moléculas oxigenadas capazes de estabelecer pontes de hidrogênio (ZENG et al., 2011; CUNHA et al., 2012). Estudos recentes têm confirmado que o óleo de melaleuca apresenta atividade de amplo espectro e tem sido apontado como um potente antibacteriano, antifúngico e anti-inflamatório (LINDLEY et al., 1998).

O óleo possui amplo espectro de ação antibacteriana, possuindo efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em baixas concentrações, antifúngico e antiviral (CARSON et al., 2006). Foi avaliada a ação do óleo de melaleuca sobre amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, resistentes a antibióticos. Os autores observaram que em menos de 60 minutos o óleo foi capaz de inativar todas as bactérias, exceto o *Staphylococcus aureus* (MAY et al. 2000). Em pacientes gestantes HIV positivos a eficácia do óleo essencial de Melaleuca é um potente antifúngico com significativa resposta contra as leveduras do gênero (Costa et al 2010). A atividade da melaleuca *in vitro* e *in vivo* é considerável no tratamento de estomatite dentária, quando incorporadas ao condicionador de tecidos (Coe-Comfort ou Fitt) quando se trata de *Candida albicans* (Catalán, 2008).

Na avaliação da farmacocinética do terpinen-4-ol no plasma e no tecido dérmico de ratos, comprovou-se atividade antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória, bem como sua atividade antitumoral contra o melanoma (Chooluck, 2012).

1.5 A utilização da melaleuca em Odontologia

Os óleos essenciais têm sido utilizados há anos na Odontologia, por exemplo, o de cravo (eugenol) devido às suas propriedades antissépticas e analgésicas (FONTANA, 2015). Cremes dentais e enxaguatórios bucais à base de produtos naturais tem sido disponibilizado comercialmente com registro da Agência nacional de Vigilância Sanitária.

O óleo de Melaleuca diminui o metabolismo celular em 33% e 44% do biofilme multiespécie em esmalte e dentina, respectivamente. Além disso, é observada a eliminação dos microrganismos *S. mutans* 21, 22 e *L. rhamnosus* 22, após 30 segundos de exposição ao óleo de melaleuca a 0,5% (Fletcher, 2005, Garozzo, 2011) A mesma concentração foi determinada por outro estudo e inibiu a adesão de *S. mutans* em botões adaptados em placa de cultura celular. Ainda de acordo com este estudo foi possível concluir que o óleo de melaleuca a 0,5% mostrou efeito sobre *S. mutans* e *L. acidophilus* em planctônicos. (Fletcher, 2005)

Um estudo *in vitro* observou através da microscopia eletrônica de varredura a formação de biofilme em tubos traqueais estéreis, revestidos com antissépticos bucais e óleo de Melaleuca. Constatou-se em comparação com os antissépticos bucais, a presença do óleo essencial de Melaleuca reduziu de forma expressiva o biofilme, o que pode reduzir o risco de pneumonia em pacientes de UTI, respirando por ventilação mecânica (CABRAL, 2015).

Hammer et al. (2003) utilizaram a Melaleuca em amostras de bactérias orais, dentre elas, *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Actinomyces* spp, *Fusobacterium* spp, *Neisseria* spp, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus saccharolyticus*, *Streptococcus* spp, e *Veillonella* spp. Estes autores concluíram que 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.

Após sete dias de bochecho, foi observado a redução dos microrganismos avaliados nos pacientes que utilizaram o óleo de melaleuca, sendo este efeito mantido por mais duas semanas. Este efeito não foi observado nos outros dois antimicrobianos utilizados (NOGUEIRA et al, 2013). A solução oral de melaleuca é

eficaz no tratamento da candidíase resistente ao tratamento com fluconazol em pacientes portadores do vírus HIV, demonstrando aparente efetividade (CORDEIRO 2014).

Nesse contexto, o óleo de Melaleuca pode ser considerado como opção para o tratamento das doenças periodontais. Ao contrário da clorexidina, esse óleo não mancha os dentes e a ação antimicrobiana é somada ao efeito anti-inflamatório. Os antissépticos atuais diminuem o biofilme dentário, com isso, reduzem o quadro inflamatório do periodonto (MONTEIRO, 2013).

A avaliação da ação do bochecho de melaleuca a 0,34% no crescimento e viabilidade do biofilme supragengival comparando-o ao bochecho com clorexidina a 0,1% e placebo foi realizada e constatou-se que a clorexidina demonstrou maior redução do acúmulo de biofilme dentário quando comparado ao placebo, enquanto que Melaleuca comparada ao placebo não. Quanto à viabilidade do biofilme, os autores encontraram diminuição tanto para melaleuca quanto para a clorexidina, porém nesta última a diferença foi significativa (NOGUEIRA et al, 2013). Portanto, observa-se que o óleo possui boa ação antimicrobiana *in vitro* sobre microrganismos bucais, porém, são escassas as evidências clínicas da sua ação para uso em Periodontia. A eficácia contra formação e acúmulo do biofilme dentário e tratamento das alterações periodontais é tema pouco explorado (CARSON et al., 2006). As pesquisas existentes apresentam resultados diversificados não permitindo comparação, uma vez que o veículo de solubilização do óleo, protocolos e objetivos foram distintos nos diferentes trabalhos. Assim, torna-se necessária a execução de estudos para que se possa verificar a sua atuação na prevenção e tratamento das doenças periodontais.

O óleo de Melaleuca revela-se como boa opção fitoterápica para o tratamento dos problemas bucais, podendo-se inferir que o mecanismo de ação do óleo na atividade antimicrobiana ocorre pela perda da integridade e função da membrana. Na doença periodontal revela-se como alternativa à clorexidina devido aos poucos efeitos colaterais (OLIVEIRA et al, 2015).

Em Endodontia, a aplicabilidade do óleo de melaleuca já tem sido investigada (Giongo, et al 2017). É importante ressaltar que mesmo após o adequado preparo químico mecânico sob abundante irrigação com soluções antissépticas, alguns microrganismos podem permanecer no interior do sistema de canais radiculares,

levando à manutenção da doença endodôntica. Os microrganismos mais comumente encontrados em casos de insucesso do tratamento endodôntico são: os fungos como *Candida albicans*, altamente resistente ao preparo biomecânico e à medicação intracanal (VALERA et al., 2001); e as bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas como os *Enterococcus faecalis*, que possuem capacidade de sobrevivência no sistema de canais radiculares durante e após o tratamento endodôntico (HACHMEISTER et al., 2002; MANGIN et al., 2003; SHIPPER et al., 2004; SEDGLEY et al., 2005; BAUMGARTNER et al., 2007).

O pH e a liberação de cálcio ao se associar o óleo de Melaleuca Alternifolia com o hidróxido de cálcio apresenta bons resultados de desempenho (Giongo et al., 2017). O Hidróxido de cálcio como medicamento utilizados no interior do SCR tem sua eficácia comprovada, e sua associação ao óleo essencial de Melaleuca demonstrou aumento da sua performance, devido às excelentes propriedades antifúngica e antimicrobiana deste óleo essencial.

A ação de solvente suave do óleo essencial de Melaleuca também foi demonstrada em estudo *in vitro* (SINHA, J.D, 2015). Tal propriedade torna favorável o seu uso no tratamento do sistema de canais radiculares ajudando na remoção do conteúdo necrótico do canal infectado. Os autores sugerem o uso do óleo como irrigante alternativo eficaz contra *Enterococcus faecalis*.

Na prerrogativa de incorporar elementos fitoterápicos naturais com objetivo de melhorar a eficácia antimicrobiana do cimento, propõe-se o presente estudo avaliar o comportamento biológico e físico-químico desse biomaterial resultante da incorporação do óleo de Melaleuca aos cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e resinoso.

2. JUSTIFICATIVA

O óleo essencial de Melaleuca tem sido empregado na composição de produtos odontológicos como creme dental e soluções para bochecho contra microrganismos relacionados à doença cárie, doença periodontal e problemas pulpares. Alguns estudos já comprovaram benefícios da associação com a medicação intracanal, porém não existem estudos investigando o efeito desta substância nos cimentos obturadores endodônticos.

O presente projeto visa avaliar os efeitos da adição do óleo essencial de Melaleuca aos cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenole à base de resina epóxica em virtude da sua atividade terapêutica comprovada.

Este estudo pré-clínico, a partir de uma perspectiva translacional, visa contribuir para a criação de um novo material que, ao ser empregado, aumente ainda mais as chances de sucesso do tratamento endodôntico.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo principal investigar os efeitos da adição do óleo essencial de Melaleuca nas propriedades biológicas e físico-químicas de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e a base de resina epóxi.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar a propriedade de escoamento dos cimentos endodônticos Endofil^R(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) e AH Plus^R(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) em sua formulação original e modificados com óleo de Melaleuca nas concentrações de 2% e 5%.

- Avaliar e comparar a citotoxicidade dos cimentos endodônticos Endofil^R(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) e AH Plus^R(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) em sua formulação original e modificados com óleo de Melaleuca nas concentrações de 2% e 5%.

- Avaliar a influência das diluições seriadas 1:2, 1:4 e 1:8 dos extratos dos cimentos com meio de cultura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado de acordo com que regulamenta a ISO 6876 para escoamento e Iso10993-1 para citotoxicidade

Os testes realizados com materiais obturadores endodônticos, incluindo as condições de tempo,umidade e temperatura.

Os cimentos endodônticos foram manipulados de acordo com a orientação do fabricante e os ensaios realizados seguindo os protocolos estabelecidos pela ISO 6876.

Os cimentos Endofill,^R(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça)AH PLUS^R(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) foram analisados em sua formulação original e após a adição do óleo essencial de Melaleuca nas concentrações de 2% e 5% de sua composição.Dessa forma, foram estabelecidos os seguintes 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%).

4.1 Confeção de corpo de prova para Citotoxicidade

Os ensaios foram realizados usando os cimentos Endofill(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) e AH PLUS(Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça). Os cimentos endodônticos foram manipulados segundo orientação do fabricante,e a eles adicionados o óleo essencial de Melaleuca, nas concentrações de 2% e 5% em peso. A incorporação é feita pela adição do óleo ao cimento em seu estado original(puro)com base no peso inicial do cimento,usando-se 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 de 5 ml) aos cimentos calculando 2% e 5%, respectivamente, do peso inicial do cimento. Logo após foram então acondicionados em moldes de silicone com 5mm de diâmetro e 2 mm de altura,sendo o excesso removido por lâmina de bisturi estéril. O cimento modificado foi comparado com sua formulação original. Tanto no Endofill quanto no AHPLUS.

De acordo com a norma especificada (ISO10993-1 para citotoxicidade, foram denominados os grupos de cimento de acordo com a sua composição.

Estes grupos foram em triplicata levados a estufa 37 ° C, (simulando condição no interior do canal radicular) por 24 h.

4.2 Ensaio de Escoamento

Os cimentos foram manipulados de acordo com a recomendação do fabricante, e, o volume de 0,05 mL de cada grupo estabelecido foi mensurado através de uma seringa de insulina BD. Após 180 segundos do início da manipulação, no centro de uma placa de vidro esterilizada de 40 x 40 mm com 5 mm de espessura foi colocado cuidadosamente, o volume final de 0,05 mL, e, em seguida outra placa de vidro de 40 x 40 mm com 5 mm de espessura foi colocada suavemente sobre esta placa. Uma placa de vidro totalizando o peso de 120g foi colocada sobre o conjunto (ISO6876:2001) (Figura 1). O conjunto foi removido 10 minutos após o início da mistura. Os testes foram realizados em triplicata, num total de 18 amostras.

Os diâmetros dos discos formados pelo cimento comprimido foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital (Paquímetro Digital ABSOLUTE Mitutoyo Miyazaki, Japão), e o maior e menor comprimento dos discos foram comparados (X equivalendo ao diâmetro horizontal e Y ao diâmetro vertical). A média aritmética obtida foi considerada o valor do escoamento de cada formulação.



Figura 1. Disposição das placas de vidro e formação do halo de cimento onde foram obtidas as medidas do ensaio de escoamento.

4.3 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com as normas de padrão internacional ISO10993-1 no intuito de verificar a viabilidade celular dos cimentos endodônticos através da incubação de células com as formulações dos cimentos endodônticos.

4.3.1 Cultura celular

As células utilizadas nesta pesquisa foram do tipo SAOS 2 (ATCC[®] HTB-85[™]) osteoblastos por sua semelhança de comportamento aos osteoblastos humanos nos eventos de diferenciação celular. O meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM (PAA, Germany) com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37°C em uma estufa de CO₂ (5% CO₂) foi utilizado em placas para Cultivo Celular em uma temperatura constante de 37° C por 24h.

As células foram tripsonizadas com solução de 1 a 2 ml de solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, solução de EDTA a 0,03%).

Análises periódicas por microscopia para a obtenção da quantidade de células necessária para a realização do ensaio foram realizadas. A contagem foi realizada através da câmara de Neubauer e a viabilidade das células confirmadas através do corante Azul de Tripán. A quantidade de células obtida pela razão entre a superfície do cimento e o volume do meio de aproximadamente 150 mm²/ml foi de 6,5. x10⁶ células.

4.3.2 Citotoxicidade cimentos puros e modificados

Foram preparados discos de cada formulação sob condições assépticas em um molde de silicone inerte e estéril com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura, de acordo com a norma ISO 10993-1, levados a a estufa 37 ° C, (simulando condição no interior do canal radicular) por 24 h. Após tomarem presa, as 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, para o preparo do extrato dos cimentos, os quais foram preparados ressuspendendo-se os cimento em Dulbecco'smodifiedEagle's médium – DMEM (PAA, Germany) suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina.,congelados por 24 horas Em seguida os extratos foram expostos a linhagem celular SAOS 2 durante 24he levados à estufa de CO₂ (5% CO₂), em placas para Cultivo Celular de 20 Poços, a 37° C por 24 horas para a obtenção dos extratos dos respectivos cimentos endodônticos Os grupos foram colocados em contato com o meio por uma razão entre a superfície do cimento e o volume do meio de aproximadamente 150 mm²/mL

Foi realizada a exposição às células dos extratos dos cimentos: 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%).

Logo em seguida, para cada grupo foram realizadas diluições seriadas(1:2, 1:4, e 1:8) dos extratos de cada cimento.Foram analisados os cimentos puros e diluídos,e,mais 3 controles em cada placa com o total de células cultivadas nas condições expostas no tópico anterior. No total de 6,5 x10⁶ células o total de células no experimento de cada cimento onde em cada poço conteve0,5x10⁵ células. Em seguida foi realizado o ensaio de MTT para verificar a viabilidade celular. As amostras de controle negativo foram tratadas nas mesmas condições, contudo, expostas ao meio de cultura normal.

A atividade mitocondrial foi quantificada a partir do MTT Assay Kit (ATCC, Virgínia, EUA). Após o contato das células com os extratos dos materiais obturadores, o meio foi aspirado e as células lavadas 2 vezes com 1,5ml de PBS estéril. Foi adicionado 0,0075 mg/ml de MTT em cada poço. Após a incubação por 2h, toda a solução de MTT foi retirada e adicionado 200 µl de dimetil sulfóxido(DMSO) estéril em cada poço. As placas foram agitadas por 5 minutos Vórtex e deixadas em repouso por mais 5 minutos protegidas de luz para a estabilização da cor.Foram, então, retiradas alíquotas de 100µl de cada uma das amostras, as quais foram transferidas para uma placa de 96 poços para a leitura no leitor de microplaca. A absorbância foi medida em 540 nm. Todo este protocolofoi realizado em triplicata.Esta avaliação da viabilidade celular foi realizada através de um ensaio colorimétricousando o composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil

brometo de tetrazólio (MTT), anteriormente descrito por Mosman, 1993. Neste método, a densidade ótica da solução contendo os cristais azuis de formazano produzidas por células metabolicamente ativas foi quantificado por espectrofotometria.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na propriedade escoamento foram realizados para analisar a distribuição de dados os testes de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) que demonstraram que todos os grupos testados apresentam distribuição normal. Logo, neste caso, os dados foram avaliados por meio da análise variância pelo teste ANOVA ONE WAY, sendo feita a Comparação dentro mesmo grupo-O grupo Endofill e suas 3 subdivisões (puro, modificados pelo óleo essencial de Melaleuca a 2% e 5%) e, o grupo AHPLUS e suas 3 subdivisões (puro, modificados pelo óleo essencial de Melaleuca a 2% e 5%) respectivamente. No caso da comparação entre os 2 grupos (Endofill e AHPLUS) foi realizado o teste *t-student*. Todos os testes foram feitos com nível de significância (erro tipo alfa) em 5%. Para a realização dos testes foram utilizados os softwares Primer of biostatistic e MinitabStudent.

Na propriedade citotoxicidade do Endofill os dados foram avaliados por meio da análise variância pelo teste ANOVA ONE WAY e, em seguida, o teste de comparações múltiplas entre os grupos de Endofill controle, branco, endofill a 2%, 5%; e o mesmo foi feito nos cimentos diluídos a 1:2; 1:4 e 1:8 utilizando-se o teste *Student Newman Keuls*.

Na propriedade citotoxicidade do AHPLUS, os dados foram avaliados por meio da análise variância pelo teste ANOVA ONE WAY, e logo após, como alguns grupos não se achavam dentro da normalidade, foi realizado o teste de múltiplas comparações entre os grupos de AHPLUS controle, branco, AHPLS a 2%, 5%; e o mesmo foi feito nos cimentos diluídos a 1:2; 1:4 e 1:8 e utilizando-se o teste *Kruskal Wallis*.

Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas usando o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

6.RESULTADOS

6.1 Ensaio de escoamento

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, onde se constatou a normalidade de todos os grupos. A comparação dos cimentos manipulados sem a Melaleuca e com adição de 2% e 5% foi realizada através do teste de ANOVA complementado pelo teste *post hoc* de Student-Nweman-Keuls (SNK). A comparação dos cimentos EF e AH+ considerando a mesma concentração foi feita através do teste t-student. Para todos os testes o nível de significância (α) foi de 5%. Os resultados obtidos nos ensaios e suas respectivas análises estatísticas estão apresentados na tabela 1.

Tab 1. Valores dos diâmetros médios obtidos no ensaio de escoamento e seus respectivos desvios padrão e coeficiente de variação. As letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significativa.

	EF	EF 2%	EF 5%	AH+	AH+ 2%	AH+ 5%
MEDIA	21,21 ^A	18,93 ^B	18,13 ^B	18,94 ^C	21,65 ^D	19,84 ^C
DP	0,93	0,53	0,70	1,32	0,18	0,44
CV	0,04	0,03	0,04	0,07	0,01	0,02

6.2 Ensaio de citotoxicidade

Os resultados de absorvância obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para o cimento EF todos os grupos se apresentaram dentro da normalidade. O cimento AH+ não apresentou distribuição normal para os grupos AH+ 2%, AH+5% e AH+5% 1:2. As comparações envolvendo somente grupos normais foram realizadas através dos testes ANOVA complementado pelo teste *post hoc* SNK (3 grupos ou mais), ou t-student (2 grupos). Quando envolvidos grupos não normais foram utilizados os testes de Kruskal Wallis complementado pelo teste *post hoc* SNK (3 grupos ou mais), ou Mann-Whitney (2 grupos).

6.2.1 Citotoxicidade mantendo a diluição e aumentando o percentual de Melaleuca.

Os resultados da influência do aumento da concentração de Melaleuca nos cimentos diluídos estão apresentados nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

Tab 2. Absorbância do aumento da concentração da melaleuca para os cimentos estudados como recebido. Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

	CTR	EF	EF2%	EF5%	CTR	AH+	AH+2%	AH+5%
Média	0,775 ^A	0,208 ^B	0,279 ^B	0,113 ^B	0,467 ^A	0,626 ^A	0,778 ^A	0,782 ^A
DP	0,237	0,116	0,142	0,060	0,302	0,269	0,533	0,448
CV	0,305	0,559	0,507	0,530	0,646	0,431	0,685	0,573

Tab 3. Absorbância do aumento da concentração da melaleuca para os cimentos estudados na diluição de 1:2. Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

	CTR	EF	EF 2%	EF 5%	CTR	AH+	AH+2%	AH+5%
Média	0,775 ^A	0,657 ^A	0,831 ^A	0,655 ^A	0,467 ^A	0,889 ^B	0,889 ^B	0,918 ^B
DP	0,237	0,101	0,070	0,110	0,302	0,044	0,189	0,113
CV	0,305	0,154	0,085	0,167	0,646	0,050	0,212	0,124

Tab 4. Absorbância do aumento da concentração da melaleuca para os cimentos estudados na diluição de 1:4. Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

	CTR	EF	EF 2%	EF 5%	CTR	AH+	AH+2%	AH+5%
Média	0,775 ^A	0,777 ^A	0,867 ^A	0,693 ^B	0,467 ^A	0,922 ^C	0,924 ^C	0,892 ^C
DP	0,237	0,129	0,140	0,130	0,302	0,109	0,084	0,052
CV	0,305	0,167	0,162	0,188	0,646	0,118	0,091	0,059

Tab 5. Absorbância do aumento da concentração da melaleuca para os cimentos estudados na diluição de 1:8. Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

	CTR	EF	EF 2%	EF 5%	CTR	AH+	AH+2%	AH+5%
Média	0,775 ^A	0,903 ^A	0,898 ^A	0,820 ^A	0,467 ^A	0,964 ^B	0,953 ^B	0,953 ^B
DP	0,237	0,140	0,110	0,076	0,302	0,142	0,113	0,071
CV	0,305	0,156	0,123	0,092	0,646	0,147	0,118	0,075

6.2.2 Citotoxicidade mantendo o percentual de Melaleuca e variando a diluição.

Os resultados da influência da diluição nas diversas concentrações de Melaleuca estão apresentados nas tabelas 6, 7 e 8.

Tab 6. Absorbância dos cimentos estudados sem adição de melaleuca em diferentes diluições.

	CTR	EF	EF1:2	EF1:4	EF1:8
Média	0,775 ^A	0,208 ^B	0,657 ^C	0,777 ^A	0,903 ^D
DP	0,237	0,116	0,101	0,129	0,140
CV	0,305	0,559	0,154	0,167	0,156
	CTR	AH	AH1:2	AH1:4	AH1:8
Média	0,467 ^A	0,626 ^A	0,889 ^B	0,922 ^B	0,964 ^B
DP	0,302	0,269	0,044	0,109	0,142
CV	0,646	0,431	0,050	0,118	0,147

Tab 7. Absorbância dos cimentos estudados com adição de 2% melaleuca em diferentes diluições.

	CTR	EF	EF1:2	EF1:4	EF1:8
Média	0,775 ^A	0,279 ^B	0,831 ^A	0,867 ^A	0,898 ^A
DP	0,237	0,142	0,070	0,140	0,110
CV	0,305	0,507	0,085	0,162	0,123
	CTR	AH	AH1:2	AH1:4	AH1:8
Média	0,467 ^A	0,778 ^B	0,889 ^B	0,924 ^B	0,953 ^B
DP	0,302	0,533	0,189	0,084	0,113
CV	0,646	0,685	0,212	0,091	0,118

Tab 8. Absorbância dos cimentos estudados com adição de 5% melaleuca em diferentes diluições.

	CTR	EF	EF1:2	EF1:4	EF1:8
Média	0,775 ^A	0,113 ^B	0,655 ^C	0,693 ^C	0,820 ^A
DP	0,237	0,060	0,110	0,130	0,076
CV	0,305	0,530	0,167	0,188	0,092
	CTR	AH	AH1:2	AH1:4	AH1:8
Média	0,467 ^A	0,782 ^B	0,918 ^B	0,892 ^B	0,953 ^B
DP	0,302	0,448	0,113	0,052	0,071
CV	0,646	0,573	0,124	0,059	0,075

6. DISCUSSÃO

Os resultados de escoamento dos cimentos EF e AH+ são contraditórios na literatura. Estudos apontam uma melhor propriedade do cimento EF apresentando comportamento dentro das especificações, enquanto o cimento resinoso apresentou um escoamento intermediário, com menor desempenho (Scelza et al., 2006; Sydney *et al.*, 2009; Marin Bauza *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017). Os resultados encontrados corroboram com estes estudos. Outros trabalhos demonstram que o AH+ apresenta propriedades superiores (Cora *et al.*, 2019), porém alguns utilizam metodologia diferente (Alonso et al., 2005 e Garrido *et al.*, 2010).

Até o presente momento nenhum trabalho que avaliou o escoamento estudou o efeito da Melaleuca nesta propriedade, tão pouco o efeito da sua concentração. Através deste ensaio verificou-se que a adição de Melaleuca aos cimentos pode ser benéfica ou maléfica. De acordo com a norma ISO 6876:2001, as médias do diâmetro dos discos obtidos devem apresentar um diâmetro inferior a 20mm. No cimento EF como recebido o comportamento ficou dentro das recomendações da norma, porém com a adição da substância o escoamento diminuiu ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística no efeito deletério para as adições de 2% ou de 5% ($p > 0,05$). O cimento AH+ como recebido apresentou um escoamento inferior ao cimento EF ($p < 0,05$), porém com a adição de 2% de Melaleuca este cimento apresentou uma melhoria e atendeu as recomendações da norma ($p < 0,05$). Esta diferença na piora ou melhoria das propriedades pode ser explicada pelas diferenças na natureza dos cimentos. No cimento a base de OZE o escoamento foi piorado, enquanto que no a base de resina epóxi ocorreu melhora. Outro fato interessante a ser mencionado é que agregar a Melaleuca ao AH+ 5% não causa prejuízo a sua propriedade. Agregar 2% de Melaleuca melhora as propriedades e agregar 5% não piora como ocorre no EndofilL (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça)

Clinicamente agregar a Melaleuca ao cimento EF pode prejudicar a obturação de áreas com anatomia complexa, enquanto que no AH+ ocorre o oposto. Uma baixa viscosidade do cimento gera um escoamento ideal, e consequentemente um adequado preenchimento das irregularidades e espaços entre os cimentos e as paredes dentinárias (Andinós *et al.*, 2011). Além disto, a capacidade de escoamento

auxilia na descontaminação do SCR potencializando a ação antimicrobiana do material, eliminando microrganismos presentes em áreas não alcançadas pela instrumentação(Siqueira Jr et al.,2012).Um cimento endodôntico para seu bom desempenho clínico é relevante que possua uma boa atividade antimicrobiana, seja biocompatível,não seja citotóxico e possua um bom escoamento (Orstavik, 2014).

A avaliação da citotoxicidade, por cultura celular in vitro seguindo a norma ISO10993-5é comum na literatura (Schwarze et al., 2002; De Deus et al., 2005; Takita et al., 2006). Estes ensaios podem ser realizados em 3 modalidades: contato direto,contato indireto,e por extração.No presente estudo,optou-se pelo contato direto por ser a condição mais crítica para as células e que pode ocorrer clinicamente durante a obturação do SCR.O cimento tóxico em contato com os tecidos periapicais é reconhecido como um corpo estranho pelos linfócitos T e macrófagosativando mecanismos inflamatórios (Silva et al,2005).A análise em diversas pesquisas do comportamento do cimento aos tecidos periapicais,na propriedade de citotoxicidade,visa entender os fenômenos teciduais em resposta ao contato íntimo entre cimento e tecido(Miyagaki,2011).

Ao incorporar a Melaleuca sem diluição aos cimentos pode-se observar que para o cimento EF a viabilidade celular diminuiu significativamente ($p<0,05$), já para o cimento AH+ foi aumentada ($p<0,05$). Isto está de acordo com diversos achados da literatura (Senne *et al.*,2008; Teixeira *et al.*,2017), e pode ser explicado pois o eugenol é alergênico e citotóxico (Faria Jr *et al.*, 2013). No entanto, clinicamente, a quantidade do eugenol é bem tolerada pelos tecidos,não sendo por este motivo tóxico (Fonseca *et al.*,2017).A maioria dos cimentos quando frescos apresentam uma alta citotoxicidade(Chang *et al.*,2014). O eugenol presente no cimento após a presa,tem afinidade pela camada lipídica da membrana celular de macrófagos,o que o torna mais citotóxico quando em contato com a célula(Silva et al,2005). Mesmo que seja liberado aos tecidos perirradiculares, o óleo essencial de Melaleuca não apresenta efeito citotóxico (Andrade *et al.* ,2018). As concentrações de 2 e 5% não apresentaram influência na toxicidade.

Ao diluir a concentração em 1:2, 1:4 e 1:8 observamos que a adição do óleo essencial de Melaleuca ao EF não interferiu na propriedade citotoxicidade ($p>0,05$).Porém, para o cimento AH+a toxicidade continuou reduzindo ($p<0,05$).Assim como em outros trabalhos,observou-se que a citotoxicidade dos

cimentos testados é dose dependente, ou seja, quanto mais diluído, menos citotóxico, e maior a porcentagem de células viáveis (Marins *et al.*, 2017). Isto está de acordo com as tabelas 6, 7 e 8. O comportamento superior do cimento AH+ em relação ao EF pode ser atribuído a natureza do material, os cimentos a base de resina são menos solúveis e podem aprisionar o material agregado a sua matriz. Sem incorporação o AH+ já não é tóxico, e após sua cura a matriz do material não irá permitir liberação de Melaleuca.

7. CONCLUSÃO

- Na propriedade de escoamento, a adição do óleo essencial de Melaleuca ao Endofill não foi benéfica, piorando o escoamento do cimento
- O escoamento do AH PLUS puro e no AHPLUS 5% Melaleuca não houve interferência na propriedade escoamento.
- O AHPLUS modificado pelo óleo essencial de Melaleuca a 2%, mostrou melhora na propriedade de escoamento
- O escoamento do AHPLUS é melhor que do Endofill
- Com relação a citotoxicidade, a incorporação do óleo essencial de Melaleuca a 2% e a 5% não interferiu na citotoxicidade do cimento Endofill puro, que já é citotóxico
- No AHPLUS puro, observamos que a Melaleuca não interferiu na propriedade de Citotoxicidade
- *Ao diluir a concentração em 1:2, 1:4, 1:8, observamos que a adição do óleo essencial de Melaleuca ao Endofill ao AHPLUS não interferiu na propriedade citotoxicidade*
- *A citotoxicidade dos cimentos testados é dose dependente, e, quanto mais diluído, menos citotóxico*
- *A citotoxicidade dos óleos essenciais testados é dose dependente*
- o Eugenolé mais citotóxico que o óleo essencial de Melaleuca

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albianesse, T. Cimentos Endodônticos modificados com Vanadato de prata nanoestruturado decorado com partículas de prata-Análise das propriedades físicas. Trabalho de Conclusão de Curso –Programa de Graduação de Odontologia de Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, para obtenção do título cirurgião dentista, 2020.

Alonso FS, Gomes CC, Freitas LF, Gomes IC, Pinto SS, Penina P. Análise comparativa do escoamento de dois cimentos endodônticos: Endofill e AH plus. **UFES RevOdontol**; 7(1): 48-54, 2005

Alves, T.O. Tempo de endurecimento dos cimentos endodônticos: análise dos métodos convencionais e proposta de novo método de avaliação por meio de ultrassom. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação de Odontologia Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, 2018.

Andrade, T.L.; Maiara; Oliveira, I.R.; Silva, N.S. Ação antibacteriana de um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio-xiv Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação **Universidade do Vale do Paraíba**, v.1, p.1-4, 2010

Andrade, A.O.; Scelza, M.F.Z.; Pinto, S.S.; Guaraldi, A.L.M.; Júnior, H.R. Isolation and identification of Enterococcus sp in primary endodontic infections. **Rev. bras. Odontol**, v. 68, (1), p. 20-24, 2011

Antunes, F.C.; Morgental, R.D.; Pellisser, F.V.V.; Kopper, P.M.P.; Cogo, D.M.; Oliveira, S.D. Avaliação do pH e da atividade antibacteriana de cimentos à base de MTA. Trabalho de Iniciação científica. XII Salão de Iniciação Científica Programa de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Odontologia, **PUCRS**, 2011

Baldissera, R.S. Avaliação da penetrabilidade apical dos cimentos AHPLUS e MTA Fillapex por meio da microscopia confocal. Dissertação Especialização. Programa de Especialização Endodontia. **Universidade Federal Rio Grande do Sul**, 2013

Blanco, Michelle Abreu Avaliação da Incorporação de Nanopartículas de Quitosana ao Cimento Endodôntico AH PLUS™. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2011

Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. **BJOG: Int J Gynaecol Obstet**. 2002; 109(5): 527-533.

Bonjardim LR. The diagnosis as a determinant in the Endodontic decision. **Dental Press Endod**. 2019 Jan-Apr;9(1):5-6

Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibensouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6(2), 71-79, 2016

Baldissera, R.S. Avaliação da Penetrabilidade Dentinária Apical dos Cimentos AH PLUS e MTA FILLAPEX por Microscopia Confocal. Trabalho de conclusão de curso-Especialização-Programa de Pós Graduação de Odontologia, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2013

Cabral, Danielle Bezerra. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre *Candida* spp. com aplicabilidade em tubos traqueais. Tese de Doutorado em Enfermagem –Programa de pós Graduação em Enfermagem de Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, 2014

Calcabrini, A.; Stringaro, A.; Toccaceli, L.; Meschini, S.; Marra, M.; Colone, Marancia, G.; Molinari, A.; Salvatore, G.; Mondello F. Terpinen-4-ol, The Main Component of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of

Human Melanoma Cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.122, n. 2, p. 349-360, 2004

Caldas, Nathália Lima- Incorporação da Uncária Tomentosa em Cimentos Endodônticos. Dissertação Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional. **UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO**, 2018

Candeiro, G.T.M. Avaliação da radiopacidade, escoamento, pH, e da liberação de íons cálcio de um cimento biocerâmico endodôntico. Tese de doutorado=Programa de Pós Graduação Odontologia Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**. 2012

Carson, C.; F.; Mee, B.J.; Riley, T.V- 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., **American Society for Microbiology (ASM) JOURNAL**. v.46, n.6, p.1914-1920, 2002

Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr A.B, Sinhoretto M.A, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. **J Endod**. v.33(9):p.1110-1116, 2007

Catalán, A; Pacheco J.G; Martinez, A; Mondaca, M.A. In vitro and in vivo activity of melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on Candida albicans **J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v.105 (03), p.327-332, 2008

Cechela, B. C.; Bortoluzzi, E.A; Alves, A.M.H; Teixeira, T.S; Felipp, M.C.S; Felipp, W.T. Ex vivo evaluation of coronal leakage in root canals filled with MTA FILLAPEX and AH Plus **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 71(2), p. 139-143. 2014.

Chavez de paz, L. E. Fusobacterium nucleatum in endodontic flare-ups. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, p. 179-83, 2002.

ChooLuck,K;Singh,;Sathirakul1.P..K,;Derendorf,HPlasma and dermalpharmacokinetics of terpinen-4-ol in rats following intravenousadministration. **Journal of PharmaceuticalSciences** v.68 (2),p. 135-140,2013

Cohen,Stephen ,Burns ,Richard C,**Caminhos da Polpa**,Rio de Janeiro 7º edição, editora Guanabara Koogan,

Corá,G.M;Zardo,L;Vieira,R.V;Bruzza,A;Paulos,M, evaluation of draining difference film thickness of four endodontic cements.**RevistaOdontológica de Araçatuba**, v.40,(1), p. 09-12,2019

Cordeiro,J.M,P;Lubi,N. Utilização do óleo essencial de melaleucaalternifolia como coadjuvante no tratamento da onicomiose,Trabalho de conclusão de curso .Programa de Graduação em Tecnologia em Estética e Imagem Pessoal , **Universidade Tuiuti**,2017

Costa,A.C.B.P.;Teodoro,G.;Ferreira,T.M.;Silva.F.S,Aguida,M;Khoury,S. AntifungalactivityofMelaleuca alternifolia essentialoilonyeastsisolatedfrom HIV positive pregnantwomenwith oral candidiasis.**Rev.Inst Adolfo Lutz**.,v.69(3):p.403-407

Cunha, P.A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2010). Fármacos Aromaticos e óleos essenciais.Fundação Calouste Gulbenkian. Farmacognosia e Fitoquímica, Lisboa, p. 670

De Deus,G;Filho,E.D.G;Ferreira,C.M;Filho,T.C-Intratubularpenetrationof root canal sealers**Brazilian oral Research**;v.16,n4,p332-336,2002

Faria-Júnior N. B. et al. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. **Int Endod J**, v. 46, n.8, p. 755-762, 2013

Faraoni,G;Finger,M.S;Masson,M.C;Vitorino,F.R. Comparative assessment of flow and setting time of the MTA Fillapex™ sealer.**RFO**, v. 18,(2), p. 180-184, 2013

Fonseca,D.G;Dantas,W.C.F;Crepaldi,A;Burger,F.C;Moura,M.A.ARadiopacidad e dos cimentos endodônticos. **FAIPE**, v. 2, n. 2,p.32-43,2017

FONTANA, Amanda. Eficácia do óleo de Melaleucaalternifolia sobre bactérias cariogênicas e sua citotoxicidade sobre cultura de queratinócitos. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araraquara.**Universidade Estadual Paulista,2011**

Fracasso,M.L.C;Victorino, F.R-Analysis of pH and release of calcium of associationbetweenmelaleucaalternifoliaoil and calcium hydroxide.**Rev. odontol. UNESP**, v.46, n2, p.104-108, 2017

Gabardo, M. C. L. Microbiologia do insucesso do tratamento endodôntico. **RevistaGestão&Saúde**, v. 1, n. 1, p. 11-17. 2009.

Garrido,A.D.B;Lia,R.C.C;França,S.C;Silva,J.F;AstolFilho,S;SouzaNeto,M.D
Laboratory evaluation of the phisyochemichal properties of a new root canal sealer based on copaiferamultijuga oil resin .**int Endod J**.v.43(4),p.283-291,2010

Gioppo, Alessandra; Zancanaro, V.; BELLAVER,E.H. Atividade antibacteriana do óleo essencial de Melaleucaalternifolia frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. Biotemas, Florianópolis, v. 32, n. 3, p. 35-42, 2019

Kalfas, S.; Figdor, D.; Sundqvist, G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of Actinomyces radidentis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, v. 92, p. 208-14, 2001.

Leonardi,D.P;Battisti,J.C;Klimiont,D.T;Tomazinho.P.H;Filho.F.B;Haragushiku, G.A;Tomazinho,F.S. F. In vitro evaluation of the antimicrobial activity

of some endodontic sealers **Rev,SulBrasileira Odontol**,v.6(4),p.367-373,2009

Lindley, M.G.. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. **Food Science &Technology**,v. 9,p.336-340,1998

Lisboa,I.E;Neto,U.X.S;Carneiro,E;Fariunuk,L.F;Westphalen.V.P.D Capacidade de selamento e penetração intratubular do MTA Fillapex e do AH Plus em dentes humanos.**RevOdontol UNESP**. v.46(1):p. 7-13

Love, R. M. Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**, v. 34, p. 399-405, 2001.

Machado, A.C,Oliveira, R.C.1 Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (MyracrodruonurundeuvaAllemão).**Rev. Bras. Pl. Med.**v.16, n.2, p.283-289, 2014.

Malka,V.B.Radiopacidade em cimentos endodônticos :Comparação em dois métodos in vitro.Trabalho de conclusão de curso.Programa de Graduação Odontologia.**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**,2012

Martin,G;Azeredo R.A -Analysis of root canal preparation using to clearingtechnique**Rev. odontol.UNESP**. V.43(2): p.111-118,2014

Marin-Bauza,G.A;Silva-Sousa,Y.T.C;daCunha,S.A;Rached-Junior,F.J.A;Bonetti-Filho,I;Sousa-Neto, M.D;Miranda,C.E. Physicochemical properties of endodontics sealer of different bases.**J.Appl.Oral Sci**,v20(4)p.455,461,2012

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, 2017

Mendonça,A.F.L.;Silveira,J.CF;Soares,L.C;Rangel,L.G.F.O;Toledo,L.F.C;Cruz, R.F.F.

Evaluation of the antibacterial activity of three endodontic sealers pure or associated to Iodofórmio **Rev Pro UniverSUS**,v.9(2),p.73-80,2018.

Miyagaki,D.C. A valiação da biocompatibilidade dos cimentos endodônticos em tecidos subcutâneos de ratos,e sua relação com o subtipo de macrófago M1.Dissertação Mestrado.Programa de Especialização Endodontia .Universidade Federal de Uberlândia,2011

Mukherjee PK, et al. Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of Pichia as an Antagonist of Opportunistic Fungi. **PLoS Pathog**.v.10(3),p 1-17,2014

Moreira,I.V; Abdala, K.V.P.; Alves, R.N.S; Costa, I.P.; Santos, V.F.; Batista, J.E.atividade antibacteriana dos óleos essenciais de alecrim, citronela, eucalipto e melaleuca contra enterococcusfaecalis- **58º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA**.2018

Monteiro,M.H.D.A;Macedo,H.W;Junior,A.S; Paumgartten,F.J.R. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de Melaleuca L. (MyrtaceaeJuss.)**Revista Fitos**, Rio de Janeiro,V.. 8(1): P.1-32, 2013

Moraes, S. R.; Siqueira JR., J. F.; Rôças, I. N.; Ferreira, M. C.; Domingues, R. M. Clonality of *Fusobacterium nucleatum* in root canal infections. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, p. 394-396, 2002.

Nacif,M.C.A.M;Alves,F.R.F. *E. nterococcus faecalis* in Endodontics: a challenge to success.**Rev. bras. Odontol.** v. 67(2), p.209-214,2010.

Nogueira,M.N.M;Correia,M.F;Fontana,A;Bedran,T.B.L;Spolidorio,D.M.P.Avaliação Comparativa “In Vivo” da Eficácia do Óleo de Melaleuca, Clorexidina e

Listeria sobre Streptococcus mutans e Microrganismos Totais na Saliva. , **Ver Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, , **João Pessoa**, v.13(4):p.343-49, 2013

Oliveira, A.C.M.I; Fontana, A.II; Negrini, T.C.II; Nogueira, M.N.M.II; Bedran, T.B.L.II; Andrade, C.R.II; Spolidorio, L.C.II; Spolidorio, D.M.P.II, Emprego do óleo de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.13, n.4, p.492-499, 2011

Oliveira, M.I.; Schneider, M.R.; Silva, C.M.; Moraes, M.S.A.; Schneider, R.C.S.; Kist, L.T . Extração e Caracterização do Óleo Essencial de Melaleuca e Desenvolvimento de Uma Formulação Semi-sólida de Uso Tópico. **Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul**, v. 5, n. 1, p. 50-59, 2015

Oliveira, Pedro Miguel Biocerâmicas em Endodontia. Dissertação Mestrado. Programa de Pós Graduação em Medicina Dentária. **Universidade Fernando Pessoa**, 2014

Oliveira, A.C.M.; Duque, C. Antimicrobial activity of root-canal sealers. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**; 25(1), p. 58-67

ORSTAVIK, D. Endodontic Filling materials. **Endodontic Topics, Oxford**, v. 31, p. 53- 67, 2014.

Özkömür, A.; Pinheiro, L.; Iglesias, J.E.; Mestieri, L.; Grecca, F. S. Effect of calcium hypochlorite on the bond strength of the AH Plus sealer to dentin. Trabalho Conclusão de curso. Programa de Especialização Odontologia. **Universidade do Rio Grande do Sul**, 2016

Peters, L. B.; Wesselink, P. R.; Moorer, W. R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 28, p. 95-9, 1995.

Pinheiro, E. T.; Gomes, B. P.; Ferraz, C. C.; Teixeira, F. B.; Zaia, A. A.; Souza-filho, F. J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, p. 100-3, 2003a

Pontes, S.F. O Desenvolvimento de Nanoemulsões de Óleos Essenciais Incorporadas em Filme de Metilcelulose para Uso em Alimentos. Tese Doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, **Universidade Federal de Viçosa**, 2013

Rocha, B.C.S.; Limoeiro, A.G.S.; Bueno, C.E.S.; Souza, F.S.; Braitt, 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. **J Dental Press Endodontics**, v. 7, p. 67-71, 2017

Rosa, R.A.; Bier, C.A.S.; Pereira, C.C.; Só, M.V.R.; Rolle, C.F.V. Simulation of soft and hard tissues and its effects on radiopacity of root canal sealers **REV Odontol Ciên**. v. 26(4), p. 326-330, 2011

Santos, T.C.; Pécora, J.D. Estudos in vitro do efeito do aumento da temperatura das soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação de Odontologia Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, 1999

Scelza MFZ, Scelza P, Costa RF, Câmara A. Estudo comparativo das propriedades de escoamento, solubilização e desintegração de alguns cimentos Endodônticos. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. v. 6(3), p. 243-247, 2006

Senne, M.I.; Lemos, N.; Fidel, S.R.; Fidel, R.A.S. Evaluation of the cytotoxicity of three root canal sealers used in obturation of radicular canals system. **REV. SUL BRAS ODONT** v. 6, (1), p. 71-76, 2009

Seymour GJ, et al. Relationship between periodontal infections and systemic disease. **ClinMicrobiol Infect.**,v.13(4),p.3-10.,2007

Silva,P.T;Leonardo,R.T;Carlos,I.Z;Filho,I.B. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos em relação aos reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.**Revista de Odontologia da UNESP.** v.34 (1),p. 17-23,2005

Sinha,DJ;Vasudeva,A;Jaiswal,N;Tyagi,SP;Singh,JAntibacterialefficacyofMelaleucaalternifolia (Teatreeoil), Curcuma longa (Turmeric), 2% chlorhexidine, and 5% sodiumhypochloriteagainstEnterococcusfaecalis: An in vitrostudy - **SaudiEndodonticsJournal**v.5(3)p.182-186,2015

SiqueiraJR;Rôças,I.N; Lopes,H.P;Alves,F.R.F;Oliveira,J.C.M;Armada.L;Provenzano,J.C-Biological principlesofendodontictreatmentofteethwithpulpnecrosisand apical lesions**Rev.Bras.Odontol.** v.69 (1) ,p.8-14,2012

SIQUEIRA JR., J. F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J**, v. 34, p. 1- 10, 2001

Sydney, G. B.; Ferreira,M; Leonardi ,D.P; Deonísio,M.D;Batista,A. Analysis of the radiopacity of endodontic sealers using a digital radiograph system.**Rev. odontocênc.**,v.23(4),p.338-341,2008

Sydney, G. B.; Ferreira,M; Deonísio,M.D; Leonardi,D.P;Batista,A*Analysis of the flow profile of six endodontic cements.***RGO**, v. 57(1) p. 7-11,2009

Tai,K.W; Huang,F.M; Huang,M.S;Chang,Y.C. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. **J Biomed Mater Res.** V.59(1),p.73-77,2002.

Teixeira,L;Basso,F.G;Hebling,J;Costa.C.A.S;Mori.G.G;Souza,Y.T.C.S;Oliveira.C.F-Cytotoxicity Evaluation of Root Canal Sealers Using an In Vitro Experimental Model with Roots. **Braz. Dent. J.** v.28(2)p..2017

Vasconcelos,K.R.F;Júnior,V.F.V;Rocha,W.C;Bandeira,M.F.C.L. *In vitro* assessment of antibacterial activity of a dental cement constituted of a *Copaiferamultijuga* Hayne oil-resin.**Rev. bras. farmacogn.** v.18 ,p.733-738, 2008

Venturi, M. Evaluation of canal filling after using two warm vertical gutta-percha compaction techniques in vivo: a preliminary study. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.39(7), p. 538-546, 2006.

Zeng, W.C., Zhu, R.X., Jia, L.R., Gao, H., Zheng, Y., Sun, Q. Chemical composition,antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphlium affine*. **Food naChemicalToxicology**,v.49,p,1322-1328, 2011

Yu G, et al. Association between Upper Digestive Tract Microbiota and Cancer-Predisposing States in the Esophagus and Stomach. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**v23(5),p.735-741

9.ANEXOS

CITOTOXIDADE

ENDOFILL

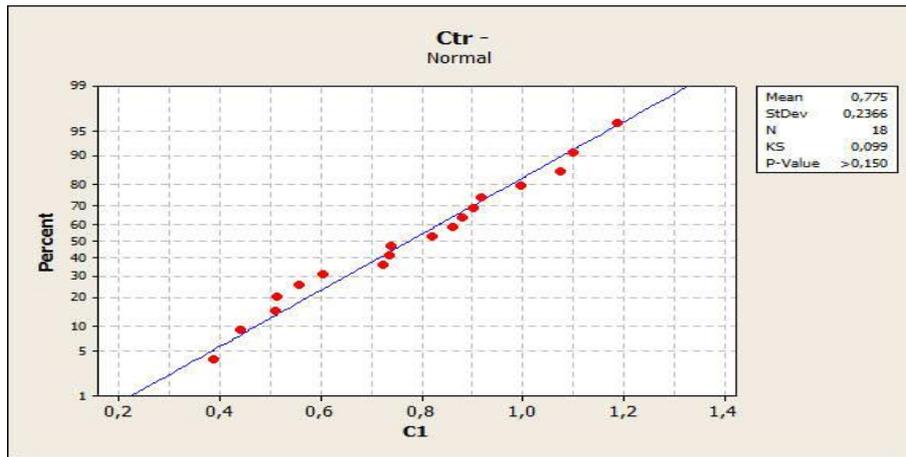


Gráfico 1 Grupo controle citotoxicidadeEndofill

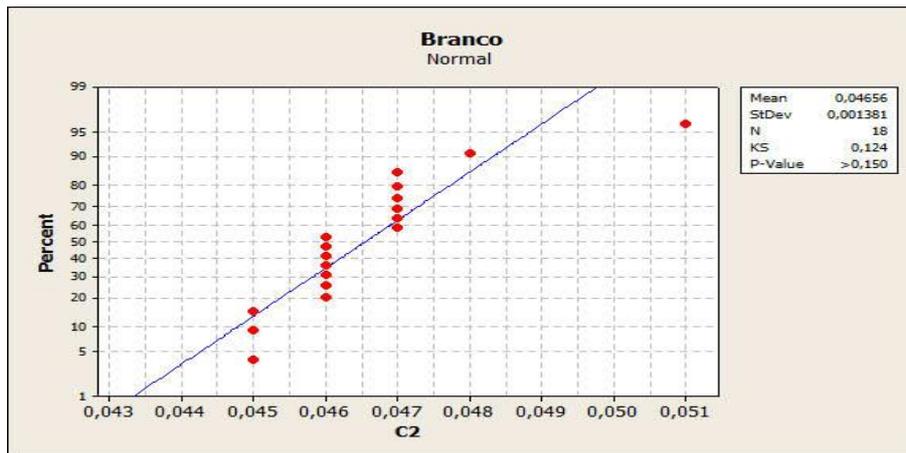


Gráfico2.Grupo branco

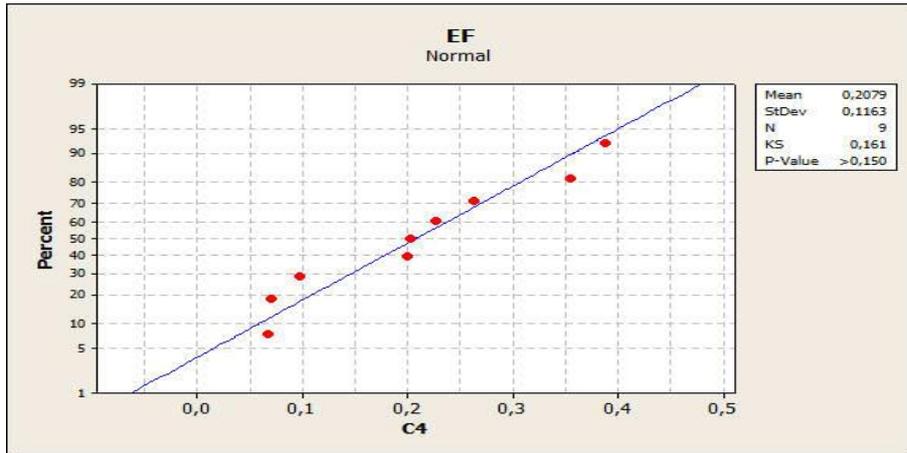


Gráfico 3. Endofill Puro

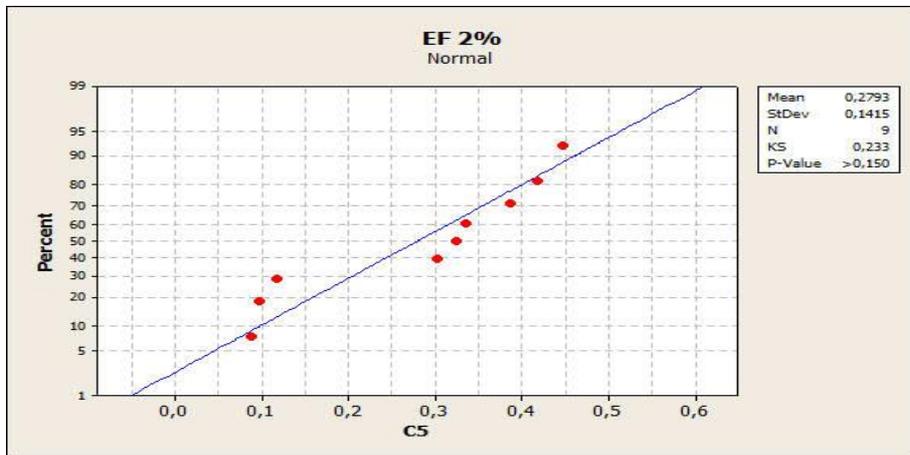


Gráfico 4. Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%

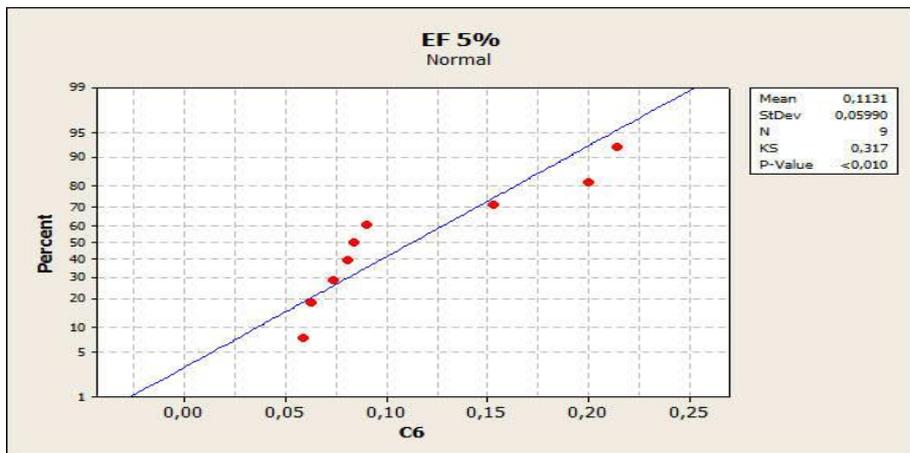


Gráfico5. Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%

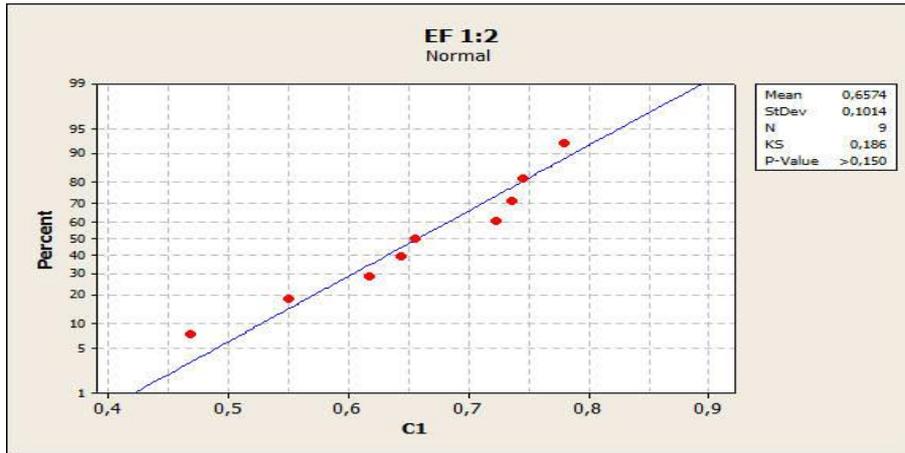


Gráfico 6.Endofill Puro Diluído 1:2

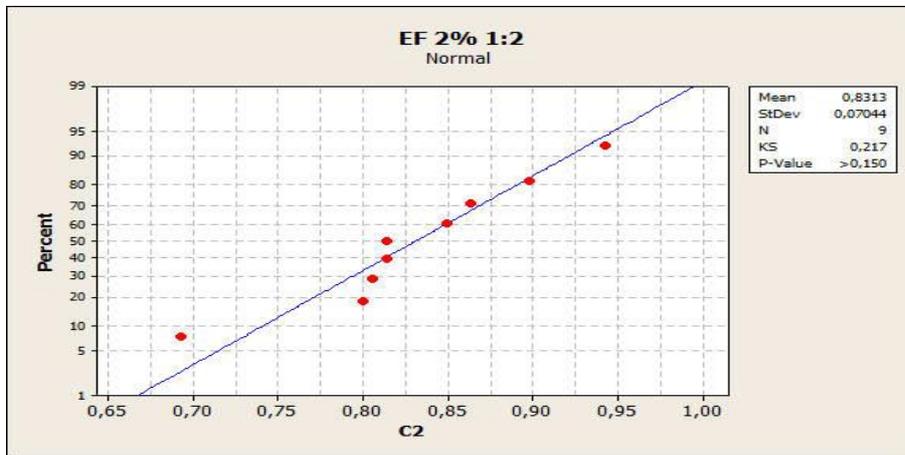


Gráfico7.Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%Diluído 1:2

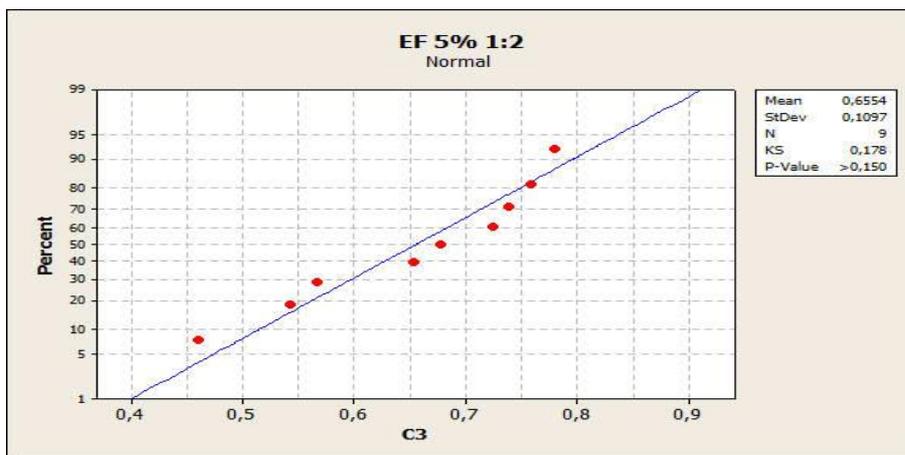


Gráfico 8.Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%Diluído 1:2

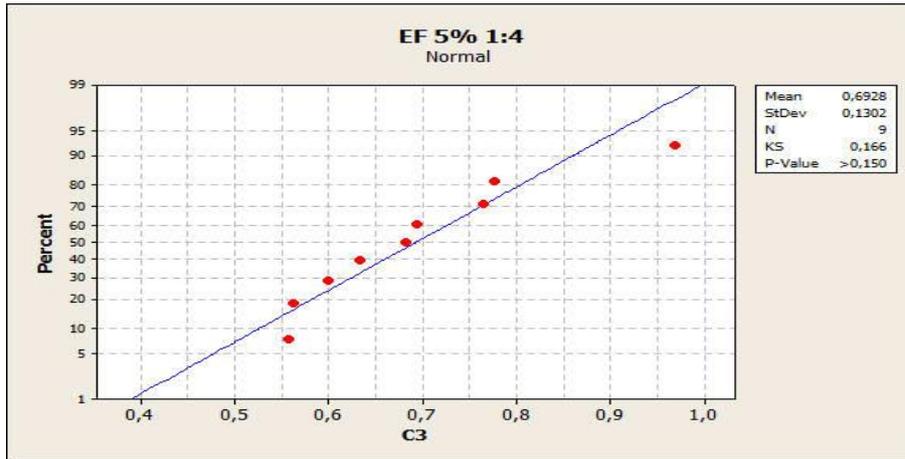


Gráfico 9. Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca Diluído 1:2

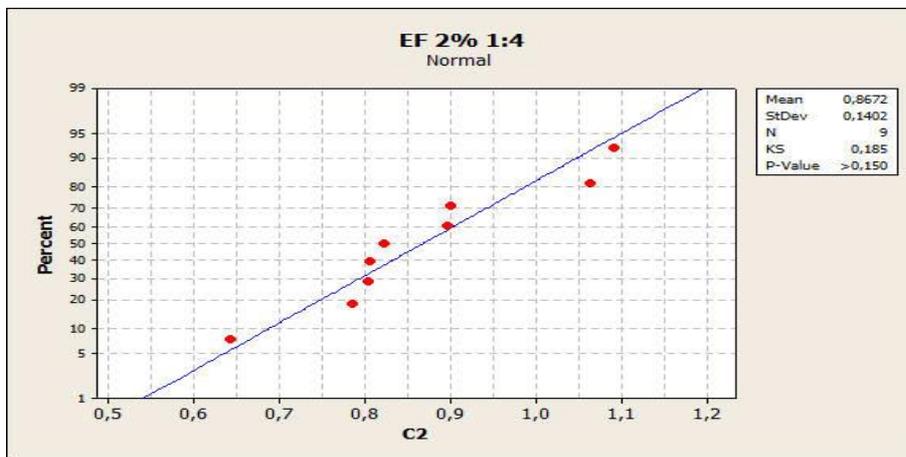


Gráfico 10. Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2% Diluído 1:4

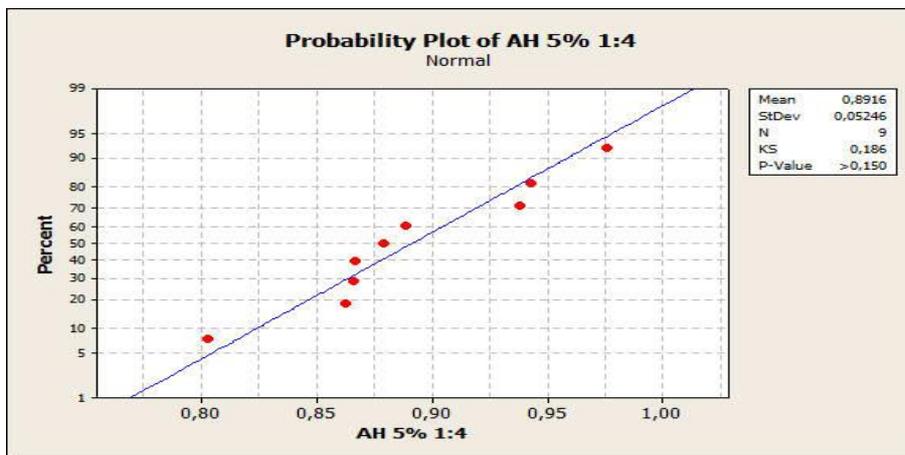


Gráfico 11. Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5% Diluído 1:4

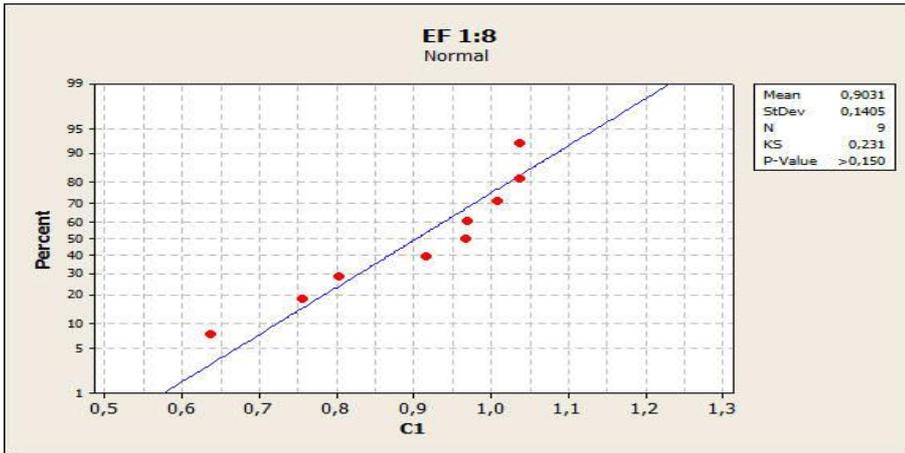


Gráfico12.Endofill Puro Diluído 1:8

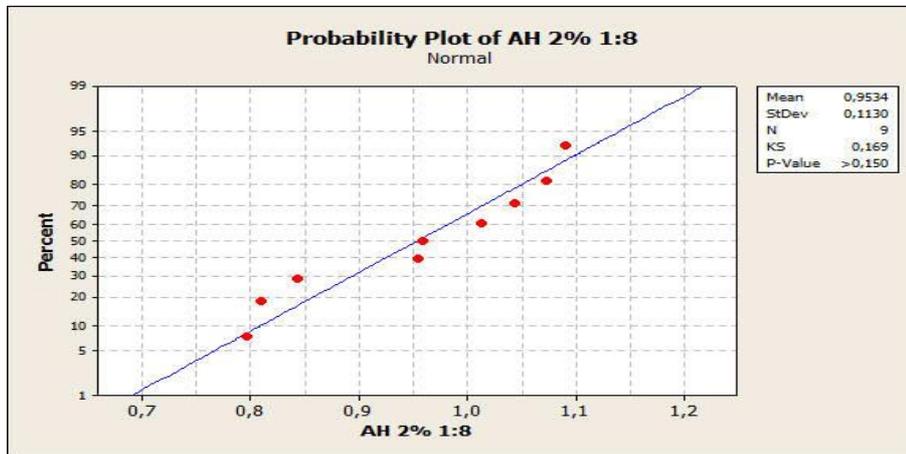


Gráfico13.Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%Diluído 1:8

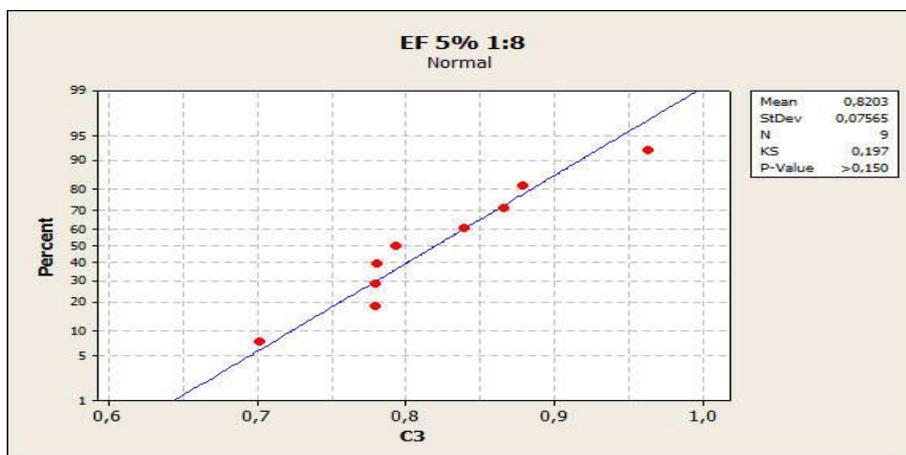


Gráfico14.Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%Diluído 1:8

AHPLUS

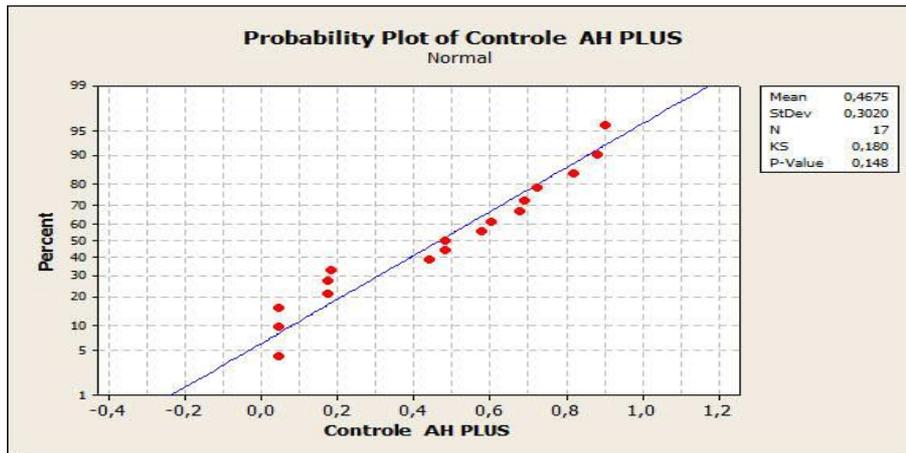


Gráfico 15. AHPLUS Controle

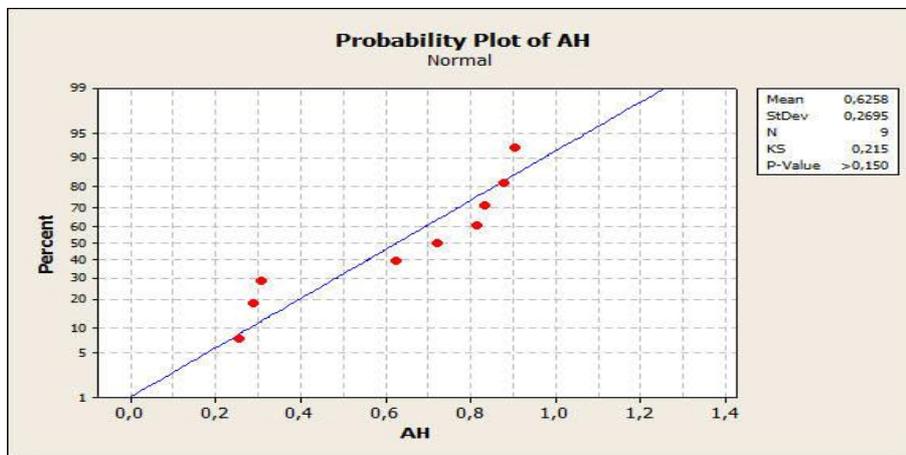


Gráfico 16. AHPLUS Puro

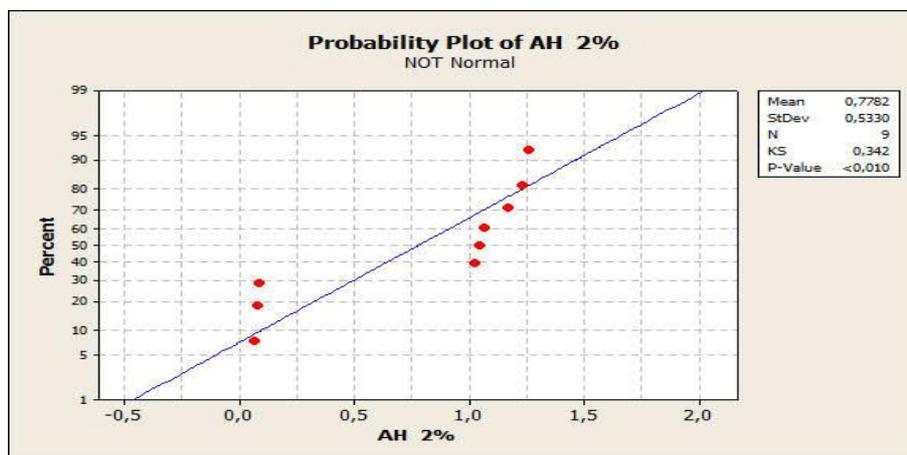


Gráfico17. AHPLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%

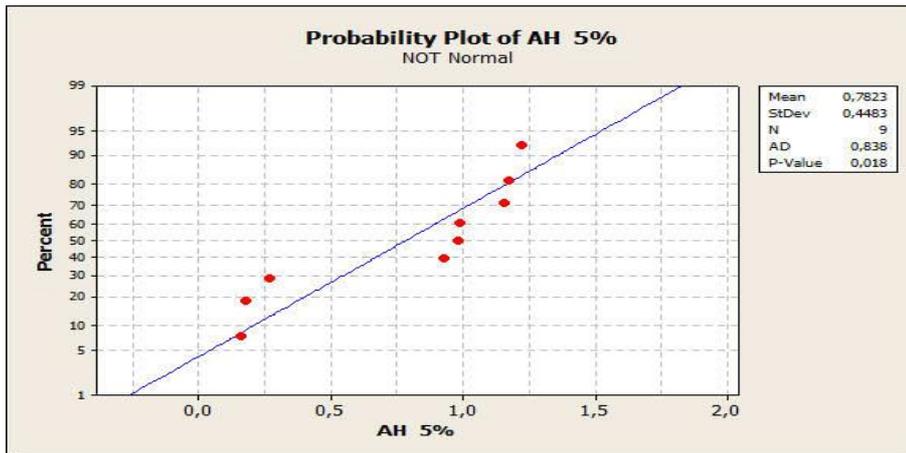


Gráfico18.AHPLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%

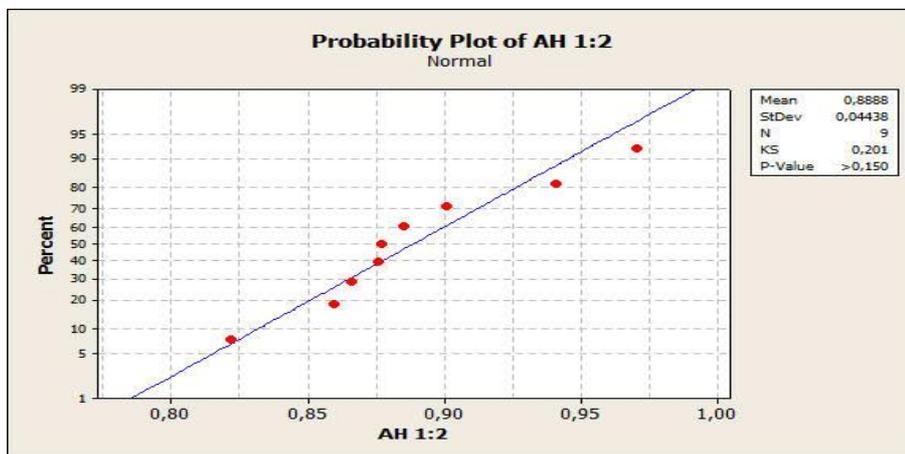


Gráfico19.AHPLUS Puro Diluído 1:2

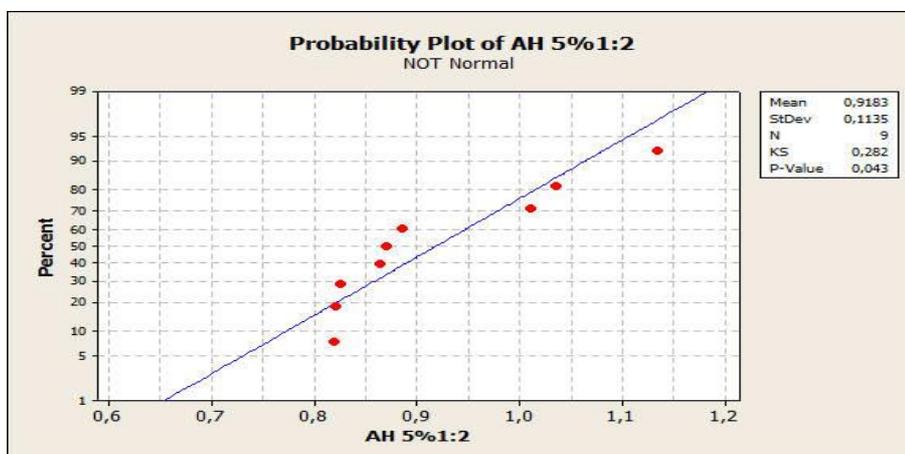


Gráfico20.AHLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2% Diluído 1:2

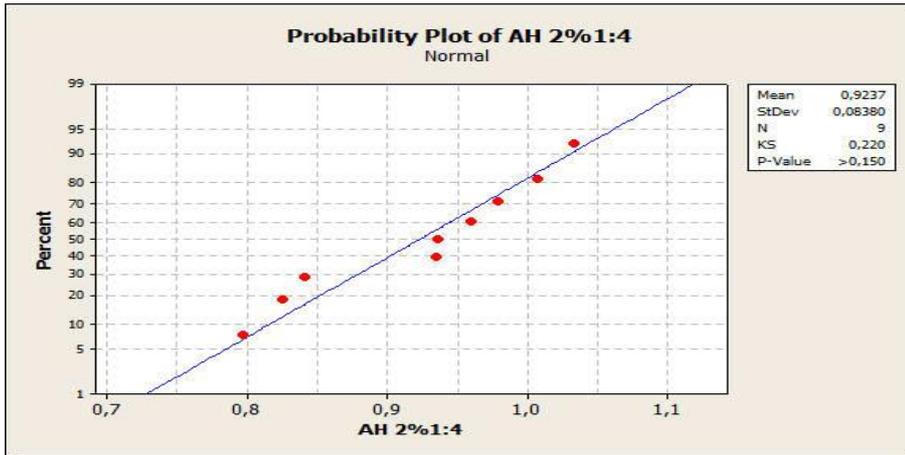


Gráfico21. AHLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%Diluído 1:2

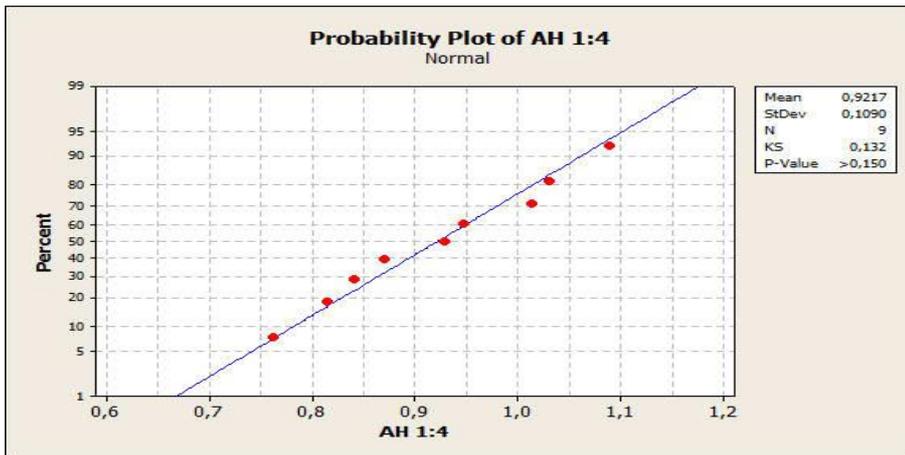


Gráfico22.AHPLUS Puro Diluído 1:4

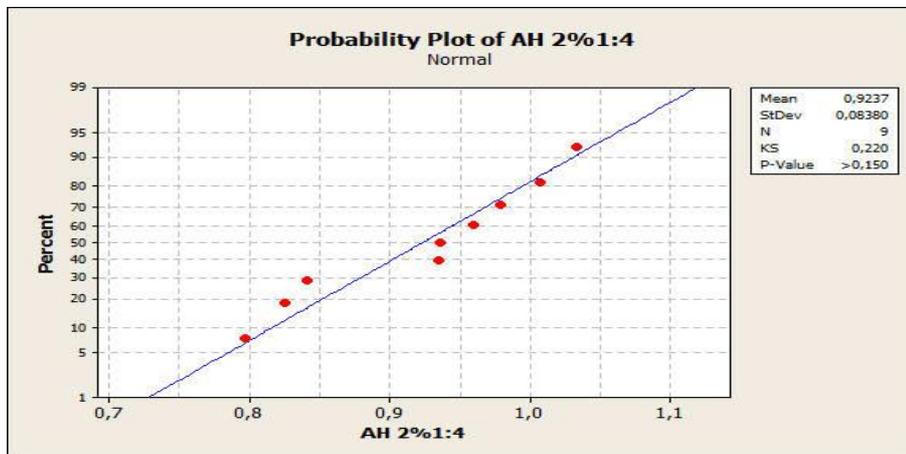


Gráfico23. AHLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%Diluído 1:

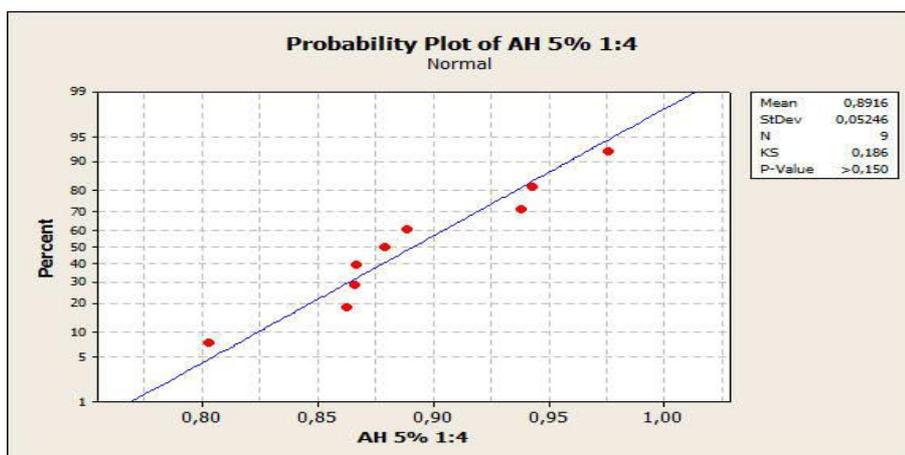


Gráfico24.AHLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%Diluído 1:

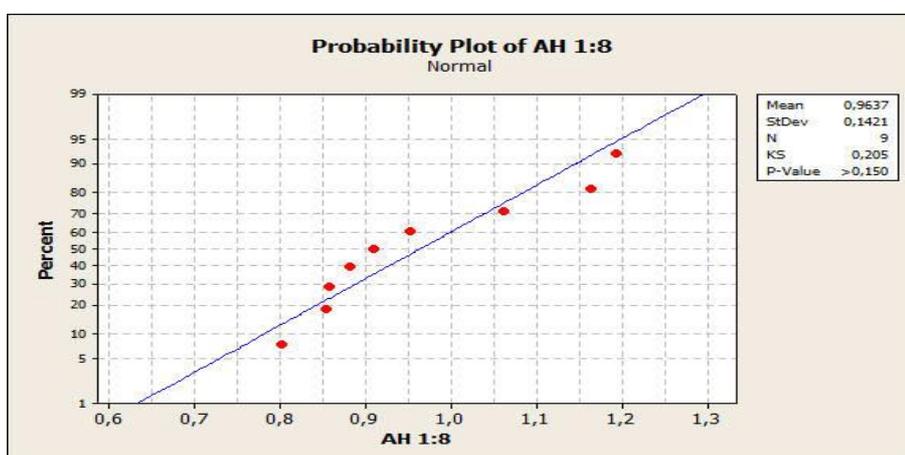


Gráfico25.AHPLUS Puro Diluído 1:8

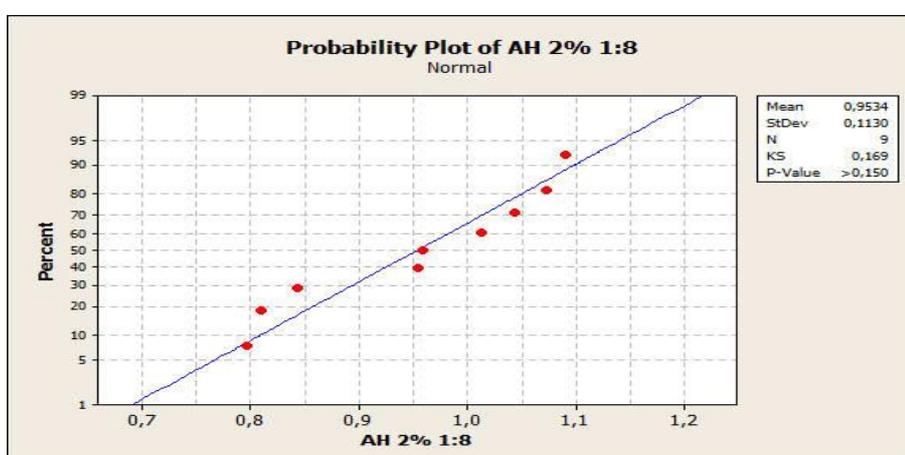


Gráfico26. AHLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%Diluído 1:8

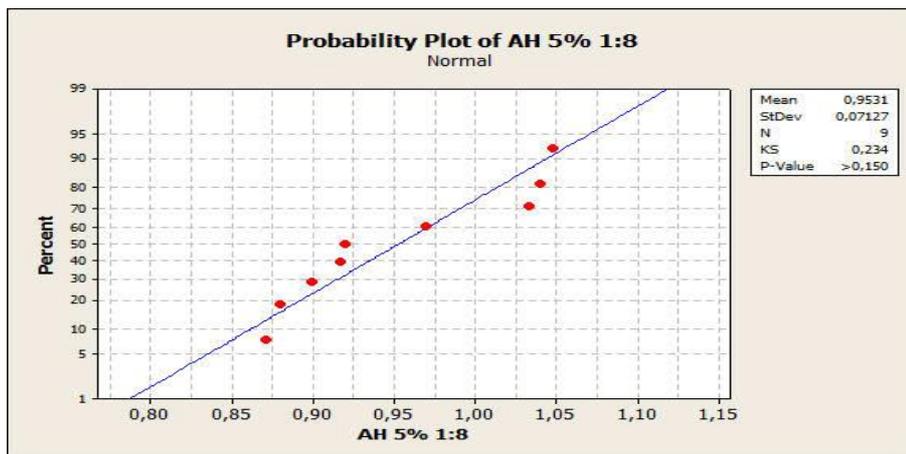


Gráfico27. AHLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5% Diluído 1:8

ESCOAMENTO ENDOFILL

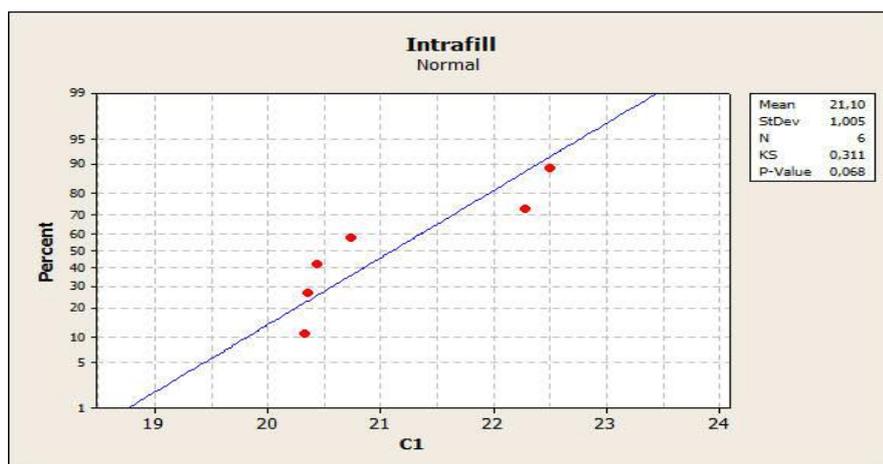


Gráfico28. Endofill Puro

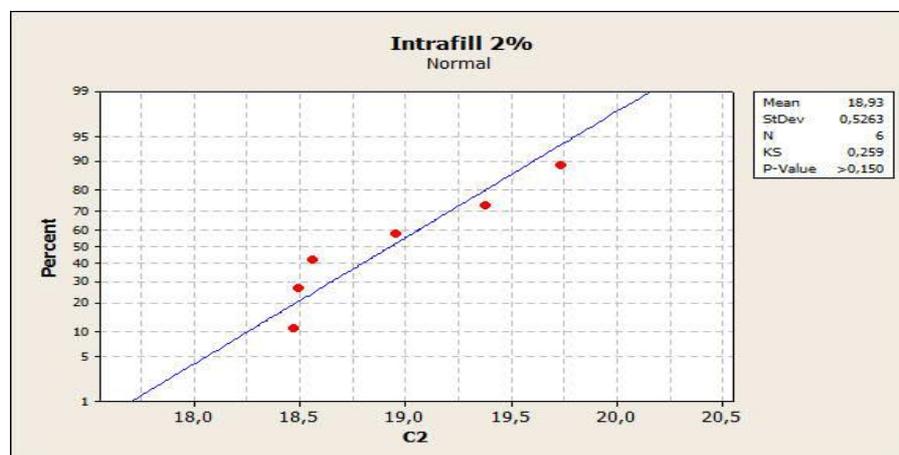


Gráfico 29. Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%

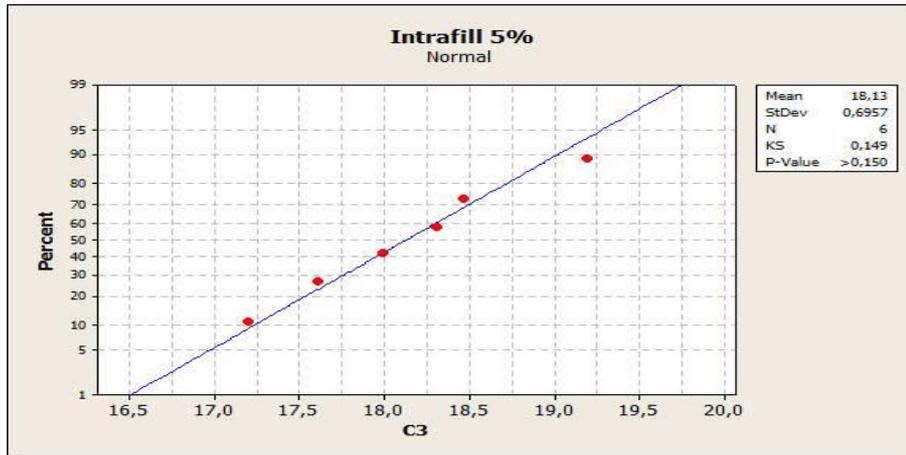


Gráfico30.Endofill com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%

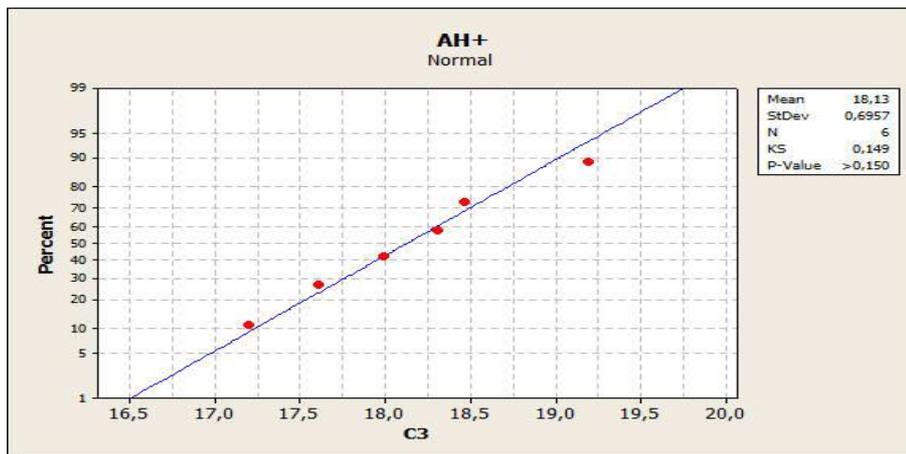


Gráfico31.AHPLUS Puro

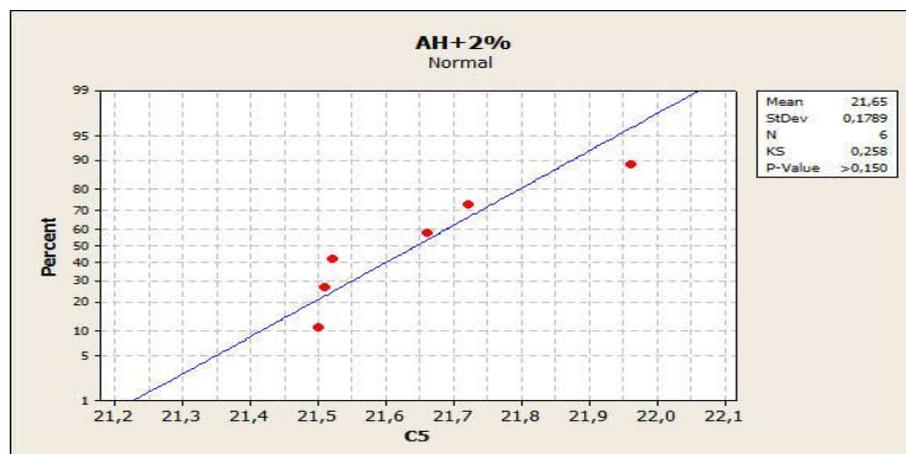


Gráfico32. AHPLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 2%

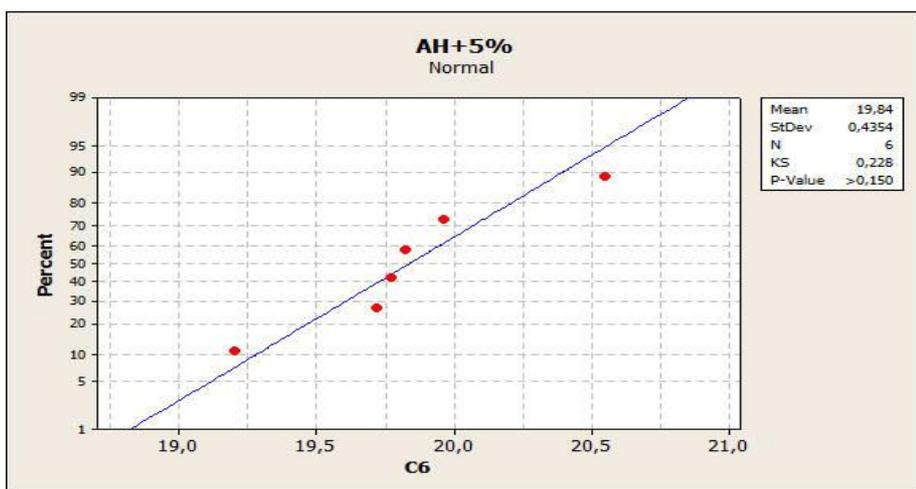


Gráfico 33.AHPLUS com adição Óleo Essencial de Melaleuca a 5%