

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/04/2021.

Vanessa Rodrigues dos Santos

**EFEITO CITOTÓXICO E AÇÃO
ANTIMICROBIANA/ANTIBIOFILME DE
HÍBRIDOS DE CURCUMINA E CINAMALDEÍDO
SOBRE MICRORGANISMOS DE INTERESSE
ENDODÔNTICO**

Araçatuba - SP
2019

Vanessa Rodrigues dos Santos

**EFEITO CITOTÓXICO E AÇÃO
ANTIMICROBIANA/ANTIBIOFILME DE
HÍBRIDOS DE CURCUMINA E CINAMALDEÍDO
SOBRE MICRORGANISMOS DE INTERESSE
ENDODÔNTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção de título
de Mestre em Ciência Odontológica - Área de
Concentração: Saúde bucal da criança

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Duque
Coorientadora: Prof^a Dr^a Aimée Maria Guiotti

Araçatuba - SP
2019

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237e Santos, Vanessa Rodrigues dos.
Efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico / Vanessa Rodrigues dos Santos. - Araçatuba, 2019
97 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque
Coorientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti

1. Curcumina 2. Cinamaldeído 3. Atividade antimicrobiana
4 Biofilmes 5. Citotoxicidade I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Vanessa Rodrigues dos Santos

Vanessa Rodrigues dos Santos

Nascimento	22.07.1992 – Santa Helena de Goiás - GO
Filiação	Antonio Roberto dos Santos Euciene Rodrigues da Silva dos Santos
2012/2016	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP.
2013/2013	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio PIBIC-CNPq.
2014/2016	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP.
2016/2016	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio PIBIC-CNPq.
2017/2017	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.
2017/2019	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Comissão Examinadora

Vanessa Rodrigues dos Santos

Defesa de Dissertação

Profa. Dra. Cristiane Duque - Orientadora Professora Associada do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba.

Profa. Dra. Aline Rogéria Freire de Castilho – Professora Doutora Colaboradora do Departamento de Odontologia Infantil, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia – FOP/UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, Campinas

Profa. Dra. Marcelle Danelon – Professora Doutora permanente no Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica, Área de Concentração Saúde Bucal da Criança, na Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba.

Epígrafe

Vanessa Rodrigues dos Santos

"Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos. " Provérbios 16:3

Dedicatória

Vanessa Rodrigues dos Santos

À Deus,

Por me conceder o dom da vida e guiar meu caminho. Vejo Suas mãos em cada momento dessa trajetória e reconheço seu cuidado em cada detalhe. As forças que por muitas vezes me faltavam vinham de Ti; nos momentos de dificuldade foste o meu apoio. Me fez acreditar que nada é difícil demais quando se confia no Senhor. Me fez enxergar aquilo que os meus olhos ainda não podiam contemplar.

Ao Senhor dedico esta conquista!

"Bendito o homem que confia no SENHOR, e cuja confiança é o SENHOR"

Jeremias 17:7

Aos meus pais,

Aqueles sem os quais nada disso seria possível. Por estarem comigo em cada fase dessa trajetória. Por todo amor e carinho dedicados a mim. Saber que tenho o apoio de vocês faz toda a diferença. Me faz sentir segura e capaz de realizar grandes sonhos, pois sei que estão sonhando ao meu lado.

Esta vitória é por vocês e para vocês!

"...honra a teu pai e a tua mãe, como o SENHOR, teu Deus, te ordenou, para que se prolonguem os teus dias e para que te vá bem na terra que o SENHOR, teu Deus, te

dá. " Deuteronômio 5:16

Agradecimentos Especiais

Vanessa Rodrigues dos Santos

Aos meus pais, Roberto e Euciene

Obrigada por estarem sempre ao meu lado, ajudando a realizar meus sonhos. Sei que lutam todos os dias para dar o melhor futuro para mim e para meus irmãos. Não medem esforços para nos ver felizes. Obrigada pelos princípios e valores ensinados a mim. Me orgulho imensamente de fazer parte dessa família e de ser filha de vocês. Te amo Pai! Te amo Mãe!

Aos meus irmãos, Victor e Renata

Obrigada maninhos por sempre poder contar com vocês e por todo apoio dado a mim. Mesmo de longe sei que torcem por mim, assim como desejo que alcancem sempre o que há de melhor nesse mundo. Amo vocês!

A minha orientadora, Cristiane Duque

Muito obrigada pelo enorme privilégio de fazer parte da sua equipe! Obrigada pela oportunidade e confiança que tem depositado em mim há quase sete anos. Tempo esse suficiente para eu poder afirmar com toda certeza quão maravilhosa é a sua pessoa. Pessoa essa de um coração generoso, humilde e sempre disposto a ajudar. Uma professora e orientadora dedicada, e que ama o que faz. Muito além de realizar suas tarefas com esmero, traz inspiração a todos a sua volta. Me sinto privilegiada por ser sua orientada e de nossa convivência ter ultrapassado os limites da universidade. Agradeço todo conhecimento transmitido a mim, assim como a paciência e o carinho. Vencemos mais essa etapa e espero que outras conquistas ainda estejam por vir.

A minha querida amiga Morganna

Muito obrigada pela amizade e companheirismo. Sempre pronta para o que eu precisasse. Sua amizade foi muito importante nessa trajetória. Momentos alegres e

tristes que passei pude ver o quão precioso é ter com quem contar. Sou feliz em saber que sempre poderei contar com você. Te amo amiga!

A minha querida amiga Karina

Agradeço a Deus por ter te colocado no meu caminho. Você é peça fundamental na execução desse trabalho. E muito mais do que uma colega de trabalho, você se tornou uma grande amiga! Obrigada por ser essa amiga de coração enorme e de grande cumplicidade. Companheira para todas as horas. Com toda certeza sua amizade fez os meus dias se tornarem mais fáceis e divertidos durante esse período. Sua luz contagia! Amo você!

Aos amigos Isabela, Caio, Heitor e Igor

Obrigada queridos amigos por nossa amizade! Bem mais fácil levar a vida com amigos do lado. Muitas vezes foram a família que eu não tinha por perto. Vou sempre levá-los em meu coração.

Ao Leonardo Morais

Obrigada por sua amizade e companheirismo. Principalmente nessa reta final sua companhia tem sido de grande importância. É bom ter você por perto!

Ao querido José Antônio

Obrigada Zé pela sua enorme paciência em me ajudar quando preciso. Você com seu jeito sério e ao mesmo tempo todo brincalhão de ser faz de você essa pessoa tão especial. Obrigada pelas gargalhadas e momentos que passamos juntos nessa trajetória.

Aos colegas de laboratório Amanda, Márjully, Thayse, Nayara, Mayra, Gabriel, Jadison, Sara, Rafaela, Jesse, Gabriela, Warley, Cecília, Gabriela Fernandes, Priscila, Francienne, Carla, Isabel e Ana Paula

Obrigada pela excelente convivência no laboratório e toda prestatividade quando foi necessária.

A minha coorientadora, Aimée Maria Guiotti

Muito obrigada por toda colaboração. Te admiro como profissional e pessoa.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP

Prof. Dr. Alberto Carlos B. Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan e Prof^a Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, muito obrigada por todo conhecimento transmitido, pela fácil acessibilidade, assim como a ótima convivência.

Aos alunos Colaboradores do trabalho: Thainara, Gabriela, Jesse, Rafaela, Warley e Gabriel Abuna

Obrigada por toda ajuda e empenho no desenvolvimento deste trabalho. O companheirismo de vocês foi muito importante.

**Ao professor e alunos colaboradores: Prof. Dr. Luís Octávio Regasini, ao
aluno Carlos Roberto Polaquini e toda equipe de trabalho do
Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, São José do Rio
Preto pelo desenvolvimento dos híbridos estudados**

Obrigada pela parceria e por toda colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria

Ricardo, Mário e Luisinho. Por manterem a organização no laboratório; por toda a ajuda e dedicação. Muito obrigada!

À Banca do Exame Geral de Qualificação e à Banca de Defesa

Muito obrigada por toda contribuição no trabalho e pelos conhecimentos trocados.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba- FOP, Unicamp, por disponibilizar o laboratório de Microbiologia e de Microscopia Confocal, através dos quais foi possível realizar parte dos ensaios desenvolvidos neste estudo.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

À Valéria, Cristiane e Lilian da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Ao Frigorífico Friboi, que permitiram a coleta dos dentes bovinos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (131205/2017-0), pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Processo 2017/05892-8) pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Mestrado.

Resumo

Vanessa Rodrigues dos Santos

Santos VR. Efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico. 2019 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2019.

Resumo

Embora o tratamento endodôntico convencional reduza significativamente a microbiota presente no interior dos canais radiculares, a permanência de microrganismos devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e a resistência destes ao tratamento químico-mecânico pode ocasionar infecções persistentes ou secundárias. Muitos estudos têm explorado o uso de fitoquímicos, buscando obter novos compostos que apresentem propriedades farmacológicas. A curcumina, pigmento amarelo isolado dos rizomas da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), e o cinamaldeído, substância volátil responsável pelo odor e sabor das cascas dos caules de plantas do gênero *Cinnamomum* (Lauraceae) são possíveis substâncias promissoras. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de compostos híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico. Foram realizados ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do cinamaldeído, da curcumina e dos 23 híbridos sobre *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum*. Os melhores compostos foram avaliados em ensaios de biofilme simples (cada cepa bacteriana isoladamente) e dual-espécies (*E. faecalis* + *L. casei*, *E. faecalis* + *S. mutans*, *E. faecalis* + *A. israelii*, *E. faecalis* + *F. nucleatum*) em placas de poliestireno objetivando-se determinar o efeito sobre o metabolismo bacteriano utilizando o ensaio de XTT e sua viabilidade através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), após 24 ou 48 horas de exposição ao composto. A toxicidade também foi avaliada sobre fibroblastos (linhagem L-929) utilizando o ensaio de methyltetrazolium (MTT). Além disso, biofilmes mistos com as mesmas espécies bacterianas selecionadas e multiespécies com amostras de biofilme humano foram formados em dentina radicular de dentes bovinos e após tratamento de 48 horas com o composto/controle, foram avaliados por microscopia confocal. Os dados apresentaram distribuição normal e as diferenças entre grupos (antimicrobianos e

tempos de crescimento – 1 ou 2 semanas) foi analisada por ANOVA (One-way ou Two-way) seguido pelo teste de Tukey. Dos 25 compostos testados, 9 deles apresentaram efeito inibitório para, no mínimo, uma das espécies bacterianas testadas com valores de MIC/MBC variando entre 0,009 a 0,625 mg/mL. O composto LA11 e o controle clorexidina (CHX) apresentaram o melhor efeito inibitório para todas as espécies bacterianas testadas e, por este motivo, foram selecionados para os ensaios subsequentes. LA11 apresentou compatibilidade em fibroblastos em concentração superior à da Clorexidina (CHX) e teve efeito superior ou semelhante à CHX, reduzindo estatisticamente o metabolismo e viabilidade bacteriana nos biofilmes simples e dual-espécies, sendo que biofilmes de *S. mutans* foram os mais afetados. Para os biofilmes formados em dentina radicular, LA11 teve efeito significativo sobre os biofilmes mistos com redução de 85,93%, enquanto que nos biofilmes multiespécies, a redução microbiana foi de 33,76%. Conclui-se que o composto híbrido LA11 apresentou citocompatibilidade e efeito antimicrobiano e contra biofilme de espécies bacterianas relacionadas às infecções radiculares e poderia ser uma opção de agente antimicrobiano para aplicação no tratamento endodôntico.

Palavras-chave: Curcumina, Cinamaldeído, Atividade antimicrobiana, Biofilme, Citotoxicidade

Abstract

Vanessa Rodrigues dos Santos

Santos VR. Cytotoxic effect and antimicrobial action / antibiofilm of hybrids of curcumin and cinnamaldehyde on microorganisms of endodontic interest. 2019 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2019.

Abstract

Although conventional endodontic treatment significantly reduces the microbiota present inside the root canals, the permanence of microorganisms due to the anatomical complexity of the root canal system and their resistance to chemical-mechanical treatment can lead to persistent or secondary infections. Many studies have explored the use of phytochemicals, seeking to obtain new compounds that present pharmacological properties. Curcumin, a yellow pigment isolated from *Curcuma longa* rhizomes (Zingiberaceae), and cinnamaldehyde, the volatile substance responsible for the odor and taste of plant stems of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae) are possible promising substances. The objective of the study was to evaluate the cytotoxic effect and antimicrobial action / antibiofilm of hybrid compounds of curcumin and cinnamaldehyde on microorganisms of endodontic interest. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBM) of cinnamaldehyde, curcumin and 23 hybrids on *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii* and *Fusobacterium nucleatum* were determined. The best compounds were evaluated on single biofilms (single bacterial strain) and dual-species biofilms (*E. faecalis* + *L. casei*, *E. faecalis* + *S. mutans*, *E. faecalis* + *A. israelii*, *E. faecalis* + *F. nucleatum*) in polystyrene plates to determine the effect on bacterial metabolism using the XTT assay and its viability by counting Colony Forming Units (CFUs) after 24 or 48 hours of exposure to the compound. Toxicity was also evaluated on fibroblasts (L929 cell line) using the methyltetrazolium (MTT) assay. In addition, mixed biofilms with the same bacterial species selected and multispecies with human biofilm samples were formed in the dentinal root of bovine teeth and after 48 hours treatment with the compound / control, they were evaluated by confocal microscopy. The data presented

normal distribution and the differences between groups (antimicrobials and growth times - 1 or 2 weeks) were analyzed by ANOVA (One-way or Two-way) followed by the Tukey test. Of the 25 compounds tested, 9 of them had inhibitory effect for at least one of the bacterial species tested with MIC / MBC values ranging from 0.009 to 0.625 mg / mL. The LA11 compound and the chlorhexidine control (CHX) had the best inhibitory effect for all bacterial species tested and were therefore selected for subsequent assays. LA11 showed a higher concentration of chlorhexidine (CHX) in the fibroblasts and had a CHX-like or higher effect, reducing bacterial metabolism and viability in single and dual-species biofilms, with *S. mutans* biofilms being the most affected. For biofilms formed in root dentin, LA11 had a significant effect on mixed biofilms with a reduction of 85.93%, whereas in the multispecies biofilms, the microbial reduction was 33.76%. It is concluded that the hybrid compound LA11 presented cytocompatibility and antimicrobial effect and against biofilm of bacterial species related to root infections and could be an option of antimicrobial agent for application in endodontic treatment.

Keywords: Curcumin, Cinnamaldehyde, Antimicrobial activity, Biofilm, Cytotoxicity

Lista de Figuras

Vanessa Rodrigues dos Santos

Lista de Figuras

Figura 1	Planejamento dos Híbridos Curcumina-Cinamaldeído das Série I, II e III	68
Figura 2	Esquema representando a reação química entre cinamaldeído (1) e a subunidade acetofenona da curcumina (2) que gerou os híbridos supracitados.	69
Figura 3	Média (DP) da porcentagem de metabolismo dos fibroblastos L929 expostos aos compostos LA11 e CHX. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$.	72
Figura 4	Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a atividade metabólica dos biofilmes simples formados por 1 semana ou 2 semanas. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$.	73
Figura 5	Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes simples formados por 1 semana ou 2 semanas. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$.	74
Figura 6	Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a atividade metabólica dos biofilmes dual-espécies de <i>E. faecalis</i> e as demais espécies testadas, formados por 2	75

semanas. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$.

- Figura 7** Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes dual-espécies de *E. faecalis* e as demais espécies testadas, formados por 2 semanas. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$. 76
- Figura 8** Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes mistos com as cepas padrão testadas, formados por 2 semanas em dentina radicular. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$. 77
- Figura 9** Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes multiespécies formados a partir de amostras de biofilmes supra e subgingival humano, formados por 2 semanas em dentina radicular. ^A Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com ANOVA e Tukey, considerando $p < 0.05$. 78
- Figura 10** Imagens 2-D obtidas por microscopia confocal representativas dos biofilmes mistos (A,B,C) e biofilmes multiespécies (D,E,F) formados em dentina radicular e expostos à CHX (A,D); LA11 (B, E) e controles: (C) biofilme misto e (F) biofilme multiespécies. 79

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1	Estrutura química dos compostos híbridos mostrando os substituintes químicos (OH, NH ₃ , OCH ₃ , CH ₃ e CF ₃)	69
Tabela 2	Valores de CIM e CBM (em mg/mL) para os compostos híbridos e controles	70

Sumário

Vanessa Rodrigues dos Santos

Sumário

Resumo	30
Introdução	32
Material e Métodos	38
Resultados	47
Discussão	52
Referências	58
Figuras e Tabelas	68
Anexo A	81
Anexo B	82
Anexo C	83
Anexo D	86
Anexo E	87
Anexo F	89
Anexo G	90
Anexo H	93
Anexo I	94

Efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico

Autores:

Vanessa Rodrigues dos Santos^a, Karina Sampaio Caiaffa^b, Jesse Augusto Pereira^a, Carlos Roberto Polaquini^c, Luis Octávio Regasini^c, Cristiane Duque^a

^aDepartamento de Odontologia Infantil e Social, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil.

^bDepartamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil.

^cLaboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências do Ambiente, Instituto de Biociências, Ciências Humanas e Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José do Rio Preto, Brasil.

** Correspondência:*

Departamento de Odontologia Infantil e Social, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil. Rua José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, 16015050, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Telefone: 55-18-36363315.

E-mail: cristianeduque@yahoo.com.br, cduque@foa.unesp.br

***O manuscrito está de acordo com as normas da Revista Archives of Oral Biology**

<https://www.elsevier.com/journals/archives-of-oral-biology/00039969/guide-for-authors>

Resumo

Objetivos: avaliar o efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de compostos híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico.

Métodos: Foram realizados ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos sobre *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum*. Os melhores compostos foram avaliados em ensaios de biofilme simples e dual-espécies em placas de poliestireno para determinar o efeito sobre o metabolismo e a viabilidade de espécies bacterianas após exposição aos compostos. A toxicidade também foi avaliada sobre fibroblastos humanos. Além disso, biofilmes mistos com as mesmas espécies bacterianas selecionadas e multiespécies com amostras de biofilme humano foram formados em dentina radicular e os compostos avaliados por microscopia confocal.

Resultados: Dos 25 compostos testados, 9 deles apresentaram efeito inibitório para, no mínimo, uma das espécies bacterianas testadas. O composto LA11 e o controle clorexidina (CHX) apresentaram o melhor efeito inibitório para todas as espécies bacterianas testadas e, por este motivo, foram selecionados para os ensaios subsequentes. LA11 apresentou compatibilidade em fibroblastos em concentração superior à da CHX e teve efeito superior ou semelhante à CHX, reduzindo o metabolismo e a viabilidade bacteriana nos biofilmes simples e dual-espécies. Para os biofilmes formados em dentina radicular, LA11 teve efeito significativo sobre os biofilmes mistos com redução de 85,93%, enquanto que nos biofilmes multiespécies, a redução microbiana foi de 33,76%.

Conclusões: Conclui-se que o composto híbrido LA11 apresentou citocompatibilidade e efeito antimicrobiano e contra biofilme de espécies bacterianas relacionadas às infecções radiculares e poderia ser uma opção de agente antimicrobiano para aplicação no tratamento endodôntico.

Palavras-chave: Curcumina, Cinamaldeído, Atividade antimicrobiana, Biofilme, Citotoxicidade

Introdução

Introdução

Embora o tratamento endodôntico convencional reduza significativamente a microbiota presente no interior dos canais radiculares (Siqueira et al., 2007), a permanência de microrganismos devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e a resistência destes ao tratamento químico-mecânico pode ocasionar infecções persistentes ou secundárias (Siqueira & Rôças, 2009). A manutenção ou o desenvolvimento de lesões periapicais após o tratamento endodôntico tem sido atribuído a fatores relacionados com a presença e virulência de bactérias e fungos no sistema de canais radiculares e/ou tecidos periapicais (Sundqvist et al., 1998; Hancock et al., 2001; Nair et al., 1999; Estrela et al., 2014).

Estudos tem revelado que as bactérias Gram-positivas facultativas são mais frequentes nesses casos, incluindo *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Propionibacterium* spp., *Lactobacilos* spp., *Enterococcus faecalis*, entre outros (Siqueira & Rôças, 2009). Entretanto algumas bactérias Gram-negativas, como *Fusobacterium nucleatum*, comuns nas infecções primárias, também podem ser detectadas após o tratamento químico-mecânico (Sakamoto et al., 2008), principalmente devido a membrana externa da sua parede celular, composta de lipopolissacarídeo - LPS. Essas endotoxinas dificultam a penetração de antimicrobianos, além de apresentarem citotoxicidade e estimularem a reabsorção óssea (Jacinto et al., 2005).

A ação antimicrobiana deve ser considerada uma propriedade primordial de substâncias que são empregadas na endodontia, sejam elas irrigantes ou medicamentos intracanal. Diversas pesquisas relatam uma média de 1 a 5 espécies bacterianas, atingindo aproximadamente de 10^2 a 10^5 células/canal, mesmo após o preparo químico-mecânico, seguido ou não de medicação intracanal. (Bystrom & Sundqvist, 1985; Sjogren et al., 1997; Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Siqueira et al., 2007). O hipoclorito de sódio é ainda o agente irrigante mais amplamente utilizado em Endodontia principalmente por sua ação antimicrobiana e sua capacidade de dissolver tecidos orgânicos (Haapasalo et al., 2014; Borsini et al., 2016). Entretanto, o hipoclorito de sódio não possui toxicidade seletiva, ou seja, especialmente nas concentrações mais altas, ele dissolve tanto tecido vital quanto remanescentes pulpare necróticos, sendo tóxico para os tecidos periapicais em casos de extrusão acidental do irrigante do forame

apical para o espaço perirradicular, além de apresentar efeitos genotóxicos e potencial alérgico (Kaufman & Keila, 1989; Kuruvilla & Kamath, 1998; Serper et al., 2004; Gül et al., 2009). Outro agente utilizado como irrigante endodôntico é a clorexidina, um detergente catiônico da classe das bisbiguanidas, encontrado na forma de diacetato, hidrocloreto e digluconato, sendo a última a mais utilizada. Apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, entre outros (Mohammadi et al., 2014). Entretanto, potencial citotóxico e genotóxico também já foi descrito na literatura para clorexidina (Lessa et al., 2010; Botton et al., 2016), além de risco sistêmico, quando associada a hipoclorito de sódio, pela sua decomposição em bioprodutos reativos, como a para-chloroanilina (Basrani et al., 2007).

Uma pasta tripla de antibiótico (TAP) contendo Metronidazol, Ciprofloxacina e Minociclina, idealizada inicialmente por Hoshino et al. (1996) foi utilizada como medicação intracanal com o intuito de regeneração endodôntica. Entretanto, as tetraciclina como a Minociclina podem causar manchamento no dente, devido à sua reação com o cálcio via quelação, formando um complexo insolúvel; sendo assim a pasta a TAP foi modificada para uma pasta dupla de antibiótico (DAP) composta apenas por Metronidazol e Ciprofloxacina (Tanase et al., 1998). O Metronidazol é um composto nitroimidazol que exibe ampla atividade antiprotozoária, antibacteriana contra bacilos Gram-negativos anaeróbios, bacilos Gram-positivos esporulados e cocos anaeróbios. Ciprofloxacina é uma fluoroquinolona que apresenta ação bactericida, principalmente contra espécies Gram-negativas. Em virtude das infecções bacterianas serem polimicrobianas e essas medicações não possuem um largo espectro de ação, o uso da pasta DAP se torna limitado, além da possibilidade de resistência bacteriana. Estudos demonstram seu efeito tóxico sobre as células-tronco da papila apical, afetando negativamente sua proliferação sobre a dentina, interrompendo a liberação de fatores de crescimento (Martin et al., 2014, Kim et al., 2015, Galler et al., 2015).

Atualmente há uma corrente de pesquisadores estudando materiais biológicos que possam promover a desinfecção e estimular a regeneração tecidual natural preservando a bainha epitelial de Hertwig, a fim de permitir a diferenciação de células da papila apical em odontoblastos (Thibodeau et al., 2007; Jung et al., 2008; Ding et al., 2009; Iglesias-Linares et al., 2013). Embora os tratamentos convencionais frequentemente conduzam à resolução dos sinais e sintomas dos processos patológicos

pulpaes (Sheehy & Roberts, 1997; Bose et al., 2009; Parirokh & Torabinejad, 2010), estes promovem pouco ou nenhum benefício para a continuidade do desenvolvimento radicular, manutenção da nocicepção pulpar normal e defesa imune esperada para um dente permanente jovem (Diogenes et al., 2013, 2014). Sendo assim, a avaliação de novas alternativas de tratamento se faz necessária, principalmente no que diz respeito aos dentes permanentes imaturos, e poderá favorecer o aprimoramento e/ou substituição das técnicas e materiais já existentes.

Muitos autores tem explorado o uso de fitoquímicos, buscando obter novos compostos que apresentem propriedades terapêuticas. A curcumina é um pigmento amarelo isolado dos rizomas da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), uma espécie vegetal de amplo emprego culinário e medicinal, sendo comumente conhecida como “açafrão-da-índia”, “açafrão-da-terra”, “cúrcuma”, “turmérico” (Anand et al., 2008). Dependendo da origem e das condições do solo em que o tumérico cresce, ele contém de 2 a 9% de curcuminóides. Esses curcuminóides indicam um grupo de compostos tais como curcumina, demethoxycurcumina, bis-demethoxycurcumina e curcumina cíclica. A curcumina é o maior desses compostos e apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo fungos, como espécies do gênero *Candida* (Neelofar et al., 2011) e ação contra espécies bacterianas Gram-positivas, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, bem como Gram-negativas, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia enterocolitica* (De et al., 2009; Selvakumar e Venkataraman, 2010).

Em Odontologia, a curcumina tem sido estudada para diversas finalidades, como aplicação tópica, enxaguatório e irrigação de sítios inflamados como terapia coadjuvante no tratamento de gengivite e periodontite por sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória (Waghmare et al., 2011; Stoyell et al., 2016), inibindo importantes alvo da reação inflamatória como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (Aggarwall et al., 2013); para potencializar o efeito da quimioterapia ou radioterapia por suas propriedades antimutagências (Wilken et al., 2011), no tratamento de lesões pré-cancerosas, como fibroses de submucosa oral, leucoplasias e líquen plano (Deepa et al., 2010). Em Endodontia, estudo comparou o efeito de soluções irrigadoras contra biofilme de *E. faecalis* formado sobre substrato dentinário, e demonstrou que a

curcumina teve ação superior a clorexidina. Embora o hipoclorito de sódio (3%), tenha tido maior atividade antibacteriana que a curcumina, devido seu potencial citotóxico, a curcumina poderia ser uma alternativa natural interessante para propósitos endodônticos (Neelakantan et al., 2013).

Outro fitoquímico também conhecido por suas propriedades terapêuticas é o cinamaldeído, uma substância volátil responsável pelo odor e sabor das cascas dos caules de plantas do gênero *Cinnamomum* (Lauraceae). Dentre essas, as cascas dos caules de *C. zeylanicum* são popularmente conhecidas como “canelas”, uma especiaria de amplo emprego culinário e medicinal (Ranasinghe et al., 2013). O cinamaldeído é um aldeído aromático α,β -insaturado, caracterizado por um esqueleto fenilpropanoídico do tipo C_6C_3 . Apresenta amplo espectro de ação antibacteriana, incluindo bactérias de relevância médica, odontológica e veterinária, tais como; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Wong et al., 2008), *H. pylori* (Ali et al., 2005), *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* (Johny et al., 2010), *Prevotella bryantii* e *Prevotella rumnicola* (Ferme et al., 2008), *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* (Didry, Dubreuil & Pinkas, 1994).

A hibridação molecular é uma estratégia utilizada no planejamento de substâncias biologicamente ativas. Compreende a união de características estruturais parciais de duas ou mais substâncias bioativas em uma única estrutura. Após a junção dessas duas subunidades, por meio de uma ligação covalente, obtém-se uma nova substância, a qual pode apresentar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas diferentes das subunidades parentais (Viegas-Júnior et al., 2007). Zhi et al. (2006) sintetizaram uma série de híbridos com atividade antibacteriana, empregando como substâncias parentais; um derivado 6-anilinouacílicos, inibidores potentes de DNA polimerase III de bactérias Gram-positivas e uma fluoroquinolona, fármacos que atuam contra espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, tendo como alvo topoisomerasas e girases bacterianas. O híbrido apresentou potente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando potência antibacteriana e espectro de ação similares às substâncias parentais.

Embora a curcumina seja um potente agente antimicrobiano e que não causa toxicidade aos humanos, sendo tolerado até uma dose diária de 10 g sem causar efeitos adversos (Aggarwal et al., 2003), seu uso é limitado pela cor, falta de solubilidade na

água e relativa baixa disponibilidade in vivo (Mishra et al., 2005; Cao et al., 2014). Assim, a síntese de híbridos de curcumina com outro agente com similar potência antibacteriana, como o cinamaldeído, seria uma estratégia interessante para aumentar seu potencial terapêutico e reduzir as limitações do uso da curcumina isoladamente. Feng et al. (2015) sintetizaram 16 derivados da combinação de curcuminoides e ácidos cinâmicos e observaram que quase todos os compostos tiveram boa solubilidade, melhor atividade antioxidante que a vitamina C e ação antibacteriana superior à da ampicilina contra *S. aureus*, *S. viridans*, *E. coli* e *Enterobacter cloacae*. Com base no exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de compostos híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico. A hipótese nula é que híbridos de curcumina e cinamaldeído não serão citocompatíveis e não apresentarão efeito antimicrobiano e antibiofilme sobre microrganismos de interesse endodôntico.