



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

MARINA TOLOMEI SANDOVAL CURY

***Avaliação *in vivo* e *in vitro* das emulsões de Palmarosa e
Tomilho como agentes irrigantes finais para o tratamento
endodôntico***

Araçatuba

2023



MARINA TOLOMEI SANDOVAL CURY

***Avaliação *in vivo* e *in vitro* das emulsões de Palmarosa e
Tomilho como agentes irrigantes finais para o tratamento
endodôntico***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Doutor em Ciências - Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Eloi Dezan Junior

Co-Orientadora: Prof^ª. Assoc. Cristiane Duque

Co-Orientador: Prof. Carlos Roberto Emerenciano Bueno

Araçatuba

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C982a Cury, Marina Tolomei Sandoval.
Avaliação in vivo e in vitro das emulsões de palmarosa e Tomilho como agentes irrigantes finais para o tratamento endodôntico / Marina Tolomei Sandoval Cury. - Araçatuba, 2023
101 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Eloi Dezan Junior

1. Desinfecção 2. Emulsões 3. Endodontia 4. Inflamação
I. T.

Black D24
CDD 617.67

Aos meus pais, Eliane e Mariano, ao meu esposo Bruno e a minha cachorra Carlota (que alegra os meus dias), por toda presença, carinho e apoio nos momentos de incertezas em todas as fases da minha formação.

Agradecimentos

Agradecimentos

A Deus, pela saúde e força para concluir este trabalho. Mesmo com todas as provações e dificuldades, sabia que os planos divinos são maiores do que tudo e nunca estive desamparada.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – FOA, por ser minha segunda casa nesses 11 anos de graduação, mestrado, especialização e doutorado.

Ao professor Eloi Dezan Junior, pela orientação desde a minha segunda iniciação científica, sempre transbordando de carinho, acolhimento e dedicação. O senhor me ensinou “a pescar” na docência e na pesquisa, sempre segurando a minha mão e não me deixando desamparada. Eterna gratidão por ter escolhido o senhor como orientador por todos esses anos. Se pudesse votar no tempo, não faria diferente. Mais importante do que admirar um orientador pelo trabalho, é admirá-lo como ser humano. O senhor consegue ser admirado, não só por mim, mas por todos, das duas formas. Quem dera se todos os alunos de pós graduação pudessem desfrutar de uma orientação como a que recebi do senhor. O senhor consegue ser inspiração até no tennis! Todas as aulas eu treino pensando em melhorar cada vez mais, fazer dupla com o senhor e fazer o Bruno e a Vanessa comerem saibro.

A professora Cristiane Duque, por ser luz e fazer este trabalho existir. Obrigada por aceitar me coorientar e trazer esperança para a minha fase doutorado, quando eu estava tão perdida, achando que nada daria certo. A senhora, dona de um coração imenso e de muito conhecimento, me acolheu e por isso temos hoje esse trabalho lindo.

Ao professor Carlos Roberto Emerenciano Bueno, que nunca tive dúvidas em ter como coorientador deste trabalho. Além de coorientador, é amigo querido, parceiro de pesquisa, pai da Lelezinha que me traz tanta alegria e marido da Vanessa que se tornou uma grande amiga e paciente fiel. É o exemplo de profissional completo: excelente clínico, professor impecável e pesquisador de excelência. Quanta sorte eu tive de te conhecer em 2015.

Ao amigo Jesse Augusto Pereira responsável por me ajudar com toda a parte de cultura de bactérias deste trabalho, me ensinando com paciência e carinho toda a metodologia e

me acompanhando em todas as aventuras em Bauru para realização da análise confocal. Um futuro profissional lindo está reservado para uma pessoa tão querida e iluminada como você, Jesse.

A amiga/comadre Ana Maria Veiga Vasques por toda a parceria e amizade de todos esses anos, desde a iniciação científica até o doutorado. Passamos por alegrias, surtos, risadas, lágrimas, portas de carro batidas, muita fumaça de cigarro, muito cheiro de rato, biotério em chamas... com a gente, até a maior tragédia vira piada, sempre juntas, falando a mesma língua e nos comunicando apenas com o olhar.

Aos professores da banca:

Professor João Gomes Filho, responsável pelo meu primeiro contato com a endodontia durante a graduação, em 2014. O senhor segurou na minha mão e me acalmou quando eu achei que uma lentullo fraturada e uma radiografia de odontometria extraviada na câmara escura eram o fim do mundo. Mostrou que mesmo difícil, a endodontia e a docência eram caminhos lindos a seguir, sempre com muito carinho e acolhimento. Levo muito do que o senhor foi comigo como professor.

Professora Renata Oliveira Samuel, profissional que me inspira desde a minha graduação, quando conheci na aula sobre edema da disciplina de patologia, em 2013. Sua dedicação, talento para ensinar/pesquisar e ser humano iluminado que é influencia na profissional que busco um dia ser. Sou muito grata por ter sua presença e colaboração na defesa da tese.

Ao Professor Lucas da Fonseca Roberti Garcia, que mesmo com pouco contato que tivemos durante o SBPqO de 2019 conseguiu, de forma tão querida e acolhedora, me encorajar a buscar o sonho de ser docente.

Ao Professor João Miguel Santos pela disponibilidade em colaborar com nosso trabalho de pesquisa. Mesmo sem contato direto, tenho grande admiração por tanto que ouço o Professor Eloi falar.

Aos animais utilizados nesta pesquisa, por darem a vida pelo desenvolvimento da ciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão de Bolsa.

Ao amigo Henrique Banci, por ser confidente e me apoiar, mesmo que de fora do trabalho, durante esses três anos de doutorado. Suas palavras de apoio me ajudaram a suportar os momentos de maior tristeza e quando eu achava que devia desistir. Uma alegria que tive com o doutorado, com certeza foi ter te conhecido. Tenho muito orgulho de ter sua amizade, uma pessoa de luz, dedicada e talentosa. Desejo o MUNDO para você, porque você merece!

Aos alunos de iniciação científica que eu tive o prazer de conviver e ajudar nos TCCs desde o primeiro ano de mestrado, e que me moldaram como profissional: Bruna, Ariane, Thales, Mariana e especialmente para o Vitor Santana, que além de aluno, se tornou um dos meus melhores amigos. Tenho tanta admiração pelo profissional que se tornou, que me inspiro em você todos os dias na área de harmonização facial. Obrigada por me apresentar minha segunda área na odontologia, por me apoiar, incentivar e ensinar sempre.

Aos amigos franceses do grupo PCC Fabiana, Diego e Evandro pela amizade e diversão que transformaram meu último ano do doutorado em um ano muito mais leve. Ter vocês para conversar sobre carreira e sobre o universo das universidades foi e é de extrema importância para mim, sem contar que os meninos me ensinaram matemática para concurso. Admiro todos pelos professores que são, e agradeço sempre por ter cruzado com vocês a um ano. Se as futuras provas dos meus alunos terão uma foto da Carlota no final com o “boa prova”, foi porque eu aprendi com o Diego. Se eu levo uma bolsinha com tranqueiras para a Carlota nos passeios, foi porque eu aprendi com o Evandro. Se a minha coluna não está mais dolorida, foi porque a Fabi cuida super bem de mim no pilates. Mesmo com a distância, a amizade entre a Carlota, Pipoca e Catharina cada dia mais fortalece a dos humanos Marina, Fabiana, Evandro e Diego. Grupo que não passa um dia sequer silenciado no whatsapp. Bulldogue francês é mesmo uma religião!

A Vitória e Ana Claudia pela convivência na pós graduação, parceria em projetos e trabalho em equipe. Sozinhos não somos nada e ter profissionais como vocês para dividir trabalhos foi um presente.

A Vanessa Dezan, esposa do Professor Eloi, por sempre acolher a mim e aos outros alunos, abrindo as portas de casa para os melhores churrascos e hamburguers. Confiou

em mim, desde o início, para procedimentos de harmonização. Me sinto extremamente honrada e grata.

Ao amigo Vitor Hugo, presente que o PET FOA me deu. Me sinto grata todos os dias pelo universo ter colocado uma pessoa com tanta luz como você no meu caminho. Você me fez uma professora melhor, me ensinou como é mais importante sermos queridos do que temidos e tenho certeza que TODOS os dias que convivi com você, algo eu aprendi. Obrigada por cada sorriso que você colocou no meu rosto, todas as vezes que conversamos. Nunca ganhei uma bala do PET, mas o PET de meu o tesouro que é a sua amizade.

As minhas amigas desde 2012 Aline, Vanessa e Amanda, que por tantos anos e km de distância, ainda mantemos uma amizade linda. Sou muito grata cada minuto em ter vocês na minha vida. Se existem pessoas no mundo que eu mais desejo sucesso, essas pessoas são vocês.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcuta



Resumo Geral

Cury MTS. **Avaliação in vivo e in vitro das emulsões de Palmarosa e Tomilho como agentes irrigantes finais para o tratamento endodôntico.** 2023. 106 f. [Tese]. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e o poder flogógeno das emulsões de *Cymbopogon martinis* (Palmarosa) e *Thymus vulgaris* (Tomilho) como agentes irrigantes finais. Para o teste *in vitro*, espécimes de dentina radicular foram obtidas a partir de incisivos inferiores permanentes humanos foram contaminados com biofilme multiespécie. Após as amostras serem instrumentadas com Reciproc R25, foram testados protocolos de irrigação final com hipoclorito de sódio 1%, soro, emulsão de Tomilho e emulsão de Palmarosa. Microscopia confocal com coloração de viabilidade foi utilizada para analisar quantitativamente as proporções de bactérias mortas e vivas no interior dos túbulos dentinários, após 5 minutos e após 48 horas da irrigação final. Os resultados foram analisados com ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância estabelecido em 5%. Para a análise histológica, tubos de polietileno com os extratos foram implantados no dorso de 24 ratos machos Wistar. A análise da cápsula fibrosa e do infiltrado inflamatório foram realizadas após 7, 15 e 30 dias. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%. O grupo soro apresentou a maior invasão bacteriana, não havendo diferença entre os períodos. O hipoclorito de sódio demonstrou maior remoção de biofilme após 5 minutos ($p < 0,05$), diminuindo seu poder bactericida em 48 horas, se igualando às emulsões de Tomilho e Palmarosa em 5 minutos ($p > 0,05$). Ambas emulsões apresentaram um decréscimo na atividade antimicrobiana com o decorrer do tempo. Para a quantificação do edema, foram utilizados 36 ratos que receberam injeção intravenosa de Azul de Evans 1%. Após 30 minutos, os animais receberam injeção subcutânea na região dorsal de emulsão de Palmarosa ou Tomilho ou soro fisiológico (controle). Os animais foram eutanasiados após 3 e 6 horas, as amostras coletadas, imersas em formamida por 72h e avaliadas por espectrofotometria. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram usados para analisar os dados histológicos, e os resultados do teste edemogênico foram analisados com ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O reparo tecidual foi significativamente melhor após 15 dias do que após 7 dias ($p < 0,01$), tornando-se semelhante ao controle após 30 dias, não havendo diferença estatística entre as emulsões ($p > 0,05$). O grupo Tomilho induziu

maior edema em comparação com o grupo controle em 3 horas, e não mostrou diferença comparado com a Palmarosa. Em 6 horas, ambas as emulsões apresentaram maior edema inflamatório que o grupo controle ($p < 0,05$). Podemos constatar que as emulsões de Palmarosa e Tomilho são biocompatíveis, mesmo gerando reação inflamatória inicial, e geram exsudado inflamatório que intensifica com o decorrer do tempo. Além disso, a supressão bacteriana imediata foi efetiva por ambas emulsões, porém menos efetiva que o hipoclorito de sódio.

Palavras-chave: Desinfecção, Emulsão, Endodontia, Inflamação.

General Abstract

Cury MTS. ***In vivo* and *in vitro* evaluation of Palmarosa and Thyme emulsions as final irrigating agents for endodontic treatment.** 2023. 106 f. [Thesis]. School of Dentistry São Paulo State University, Araçatuba, 2023.

GENERAL ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity and biocompatibility of *Cymbopogon martinis* (Palmarosa) and *Thymus vulgaris* (Tomilho) emulsions as final irrigating agents. For the *in vitro* test, specimens of root dentin were obtained from human permanent mandibular incisors that were contaminated with multispecies biofilm. After samples were instrumented with Reciproc R25, final irrigation protocols were tested with 1% sodium hypochlorite (positive control), Tomilho emulsion, Palmarosa emulsion and saline (negative control). Confocal microscopy with viability staining was used to quantitatively analyze proportions of dead and live bacteria inside the dentinal tubules, after 5 minutes and after 48 hours of the final irrigation. The results were analyzed using ANOVA and Tukey's test, with a significance level set at 5%. For histological analysis, polyethylene tubes with extracts were implanted on the back of 24 male Wistar rats. The analysis of fibrous capsule and the inflammatory infiltrate were performed after 7, 15 and 30 days. Data were submitted to the Kruskal-Wallis and Dunn test, with a significance level of 5%. The group showed the greatest bacterial invasion, with no difference between periods. Sodium hypochlorite showed greater biofilm removal after 5 minutes ($p < 0.05$), decreasing its bactericidal power in 48 hours, matching Tomilho and Palmarosa emulsions in 5 minutes ($p > 0.05$). Both emulsions showed a decrease in antimicrobial activity over time. For the edema quantification, 36 rats received intravenous injection of 1% Evan's Blue. After 30 minutes, animals received subcutaneous injection in the dorsal region of Palmarosa or Tomilho emulsion or saline (control). The animals were euthanized after 3 and 6 hours, the samples collected, immersed in formamide for 72 hours and evaluated by spectrophotometry. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to analyze the histological data, and the results of the edema test were analyzed with ANOVA and Tukey's test, with a significance level of 5%. Tissue repair was significantly better after 15 days than after 7 days ($p < 0.01$), similar to the control after 30 days, with no statistical difference between the emulsions ($p > 0.05$). Tomilho group induced more edema compared to the control group at 3 hours, and showed no difference compared to Palmarosa. At 6 hours, both

emulsions showed greater inflammatory edema than the control group ($p < 0.05$). It's possible to conclude that Palmarosa and Tomilho emulsions are biocompatible and generate inflammatory exudate that intensifies over time. Furthermore, immediate bacterial suppression was effective by both emulsions, but less effective than sodium hypochlorite.

Keywords: Endodontics, Disinfection, Emulsions, Inflammation.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tabela da quantidade de amostras em cada grupo categorizadas de acordo com o escore inflamatório, média e espessura da cápsula fibrosa nos quatro períodos experimentais.

Figura 2 – Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo nos grupos experimentais

Figura 3 – Tabela com os valores médios da intensidade do exsudato inflamatório induzido pelas emulsões de Tomilho e Palmarosa e grupo controle, medidos em μg de azul de Evans contido no exsudato

Figura 4 – Gráfico dos valores médios da intensidade do exsudato inflamatório induzido pela inoculação subcutânea das emulsões de Tomilho e Palmarosa, medidos em termos de μg de azul de Evans contido no exsudato

Figura 5 – Tabela da determinação por cromatografia gasosa do EO de *Cymbopogon martini*

Figura 6 – Gráfico do cromatograma do EO de *Cymbopogon martini*.

Figura 7 – Tabela da Determinação por cromatografia gasosa do EO de *Thymus vulgaris*

Figura 8 – Gráfico do cromatograma do EO de *Thymus vulgaris*.

Figura 9 – Tabela com os valores médios da porcentagem de células mortas sobre a contagem total de células

Figura 10 – Gráfico com os valores médios da porcentagem de células mortas sobre a contagem total de células

Figura 11 – Figura com as análises em microscopia confocal de biofilme

Lista de siglas

LISTA DE SIGLAS

NaOCl	Hipoclorito de sódio
PUI	Irrigação ultrassônica passiva
EO	Óleo essencial
LPS	Lipopolissacarídeo
PGE2	Prostaglandina E2
NO	Óxido nítrico
COX	Ciclooxigenase

Sumário

	Páginas
INTRODUÇÃO GERAL	22
OBJETIVOS	27
 Artigo 1 Avaliação <i>in vivo</i> da resposta tecidual e capacidade de gerar edema das emulsões de Palmarosa e Tomilho	
Resumo	30
Introdução	31
Material e Métodos	33
Resultados	35
Discussão	39
Conclusão	41
Referências	42
 Artigo 2 Eficácia antimicrobiana das emulsões de Palmarosa e Tomilho em um protocolo final de irrigação no tratamento endodôntico	
Resumo	48
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados	54
Discussão	59
Conclusão	63
Referências	63
 CONCLUSÃO GERAL	
 ANEXO A Referências da introdução geral	70
ANEXO B Comitê de Ética em Pesquisa	74
ANEXO C Author Guidelines International Endodontic Journal	75

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

O tratamento endodôntico convencional, em casos de necrose pulpar séptica, busca a maior eliminação possível de microrganismos do sistema de canais radiculares. A ação mecânica dos instrumentos endodônticos durante o preparo biomecânico, combinada com as propriedades físico-químicas das soluções irrigadoras e medicação intracanal, promove a redução da carga bacteriana e favorece o reparo periapical (Zancan et al., 2018).

Associado à ação mecânica dos instrumentos endodônticos, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigante mais utilizada, por sua capacidade antimicrobiana (Estrela et al., 2012) e de solvente de matéria orgânica (Poggio et al., 2012). A eliminação de microrganismos é diretamente proporcional à concentração de cloro livre utilizado durante a irrigação que, por sua vez, depende da concentração de ácido hipocloroso, causando um efeito bactericida por oxidação e hidrólise de grupos sulfuretos de enzimas localizadas nas membranas bacterianas e citoplasma (Siqueira et al., 1998). Entretanto, o tamponamento da solução em meio muito alcalino, apesar de favorável no ponto de vista da estabilidade da solução, não é aconselhável no uso, visto que o emprego de uma solução com teor de cloro livre mais elevado, não necessariamente apresentará ação mais desinfetante, visto que a ação do hipoclorito depende também do pH, sendo mais eficaz em meio mais ácido (Paiva et al., 1989). De uma maneira geral, existe uma relação direta entre o poder bactericida e o poder de irritação das substâncias. Isto ocorre porque estas soluções não apresentam seletividade celular. Assim, uma substância capaz de destruir células bacterianas, também destruirá células dos tecidos periapicais, sendo não aconselhado seu uso no tratamento conservador e em casos de dentes com rizogênese incompleta, em que pode ocorrer o extravasamento não intencional da substância na região periapical (Faras et al., 2016).

A irrigação convencional com seringa e agulha é a técnica mais realizada mundialmente, porém não é totalmente eficaz no terço apical do canal radicular devido sua complexa anatomia, que pode abrigar bactérias, dificultando a ação de instrumentos e irrigantes, uma vez que mesmo após o preparo biomecânico e irrigação com hipoclorito de sódio, independentemente da concentração, há permanência de bactérias (Siqueira & Rôças, 2008; Shin et al., 2010). Portanto, as soluções irrigadoras devem ser levadas em contato direto com toda a parede do canal para uma ação efetiva (Heard & Walton, 1997),

e um protocolo final de irrigação é essencial para o sucesso do tratamento endodôntico (Zehnder, 2006).

Protocolos de irrigação são necessários para a sanificação do sistema de canais radiculares, necessário para o sucesso do tratamento endodôntico (Nair, 2006). Estudos afirmam que muitas áreas do canal radicular permanecem intocadas pelos instrumentos endodônticos, o que enfatiza a importância da ativação da irrigação para remoção de debris e microrganismos do canal radicular. Duque et al. (2017) analisaram 50 raízes mesiais de molares concluindo que para promover uma maior limpeza de áreas não tocadas por instrumentos endodônticos, realizar a agitação da solução irrigadora foi mais eficaz quando comparado com o método de irrigação e aspiração convencional.

A irrigação ultrassônica passiva (PUI), descrita inicialmente por Weller et al. (1980), é um recurso para ativação das soluções irrigantes com uso de um inserto acionado por ultrassom, induzindo a formação de cavitações e ondas acústicas e quando utilizado na solução de NaOCl, é capaz de remover uma quantidade maior de detritos, bactérias e tecido pulpar necrótico de áreas do canal radicular com anatomia complexa (Rodig et al., 2010; Vivan et al., 2016). No entanto, bactérias resistentes podem permanecer viáveis no interior do sistema de canais radiculares, colonizando os túbulos dentinários em uma profundidade de 200 a 300 μm , tornando-se inacessíveis (Horiba et al., 1990).

Realizar o tratamento endodôntico em múltipla sessão, nos casos de polpa necrosada, é o protocolo tradicional de escolha. Sabe-se que a ação mecânica dos instrumentos não é capaz de eliminar por completo os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares infectados, não atingindo a intimidade dos túbulos dentinários e sua complexidade anatômica. Ainda que o preparo biomecânico reduza significativamente o número de microrganismos, aqueles que persistiram, ao se multiplicarem, ocasionam uma recontaminação do sistema de canais radiculares, podendo estes ser novamente detectados na luz do canal principal após 72 a 96 horas (Gomes et al., 2003). Além disso, alguns microrganismos isolados como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* podem sobreviver à irrigação com hipoclorito de sódio enquanto desenvolve tolerância alcalina e resistência a antibióticos e clorexidina (Cieplik et al., 2019; Jungermann et al., 2011; Kitagawa et al., 2016; Wang et al., 2017).

Portanto, há uma necessidade de encontrar novos agentes irrigantes com farmacologia seletiva e menos toxicidade. A possibilidade de utilizar outras substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, poderá também disponibilizar condutas aplicáveis e funcionais para o tratamento de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica, as quais, para serem indicadas na prática odontológica, devem apresentar inicialmente princípios biológicos (Duncan & Izzo 2005).

O estudo de produtos naturais para potencializar o efeito da irrigação e contribuir para a eliminação de microrganismos do interior dos canais radiculares, sem causar efeitos citotóxicos, têm crescido com o passar dos anos. Dentre esses produtos naturais os óleos essenciais (EO) são amplamente propostos como antimicrobianos naturais, principalmente por serem ricos em terpenos, considerados metabólitos secundários, com conhecidos efeitos bacteriostáticos, bactericidas, propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, principalmente os terpenos modificados que contêm oxigênio na forma de hidroxila, éter, aldeído, cetona ou porções carboxílicas (Pereira et al., 2018).

Um desses EO é o da planta de tomilho (*Thymus vulgaris*), preparado a partir das folhas e flores pelo método da destilação a vapor. O EO de tomilho é útil em condições como: alívio de gastrite e enterocolite, candidíase oral, infecções respiratórias, tratamento de inchaços causados por gota ou problemas reumáticos, dores nas costas e nas articulações (Thosar et al., 2018), sendo um dos 10 EOs mais comercializados ao redor o mundo, uma vez que é usado como conservante natural de alimentos, apresenta efeito antioxidante, antibacteriano e antifúngico considerável (Ben-Jabeur et al., 2015). O EO de *T. vulgaris* pode conter até 30 monoterpenos, resultando em uma composição química diversa dos EOs derivados de plantas da mesma espécie, levando a diferentes quimiotipos, sendo os predominantes linalol e limonene.

Outra espécie utilizada nas terapias naturais é o *Cymbopogon martini*, também conhecido como Palmarosa ou Gerânio Indiano, uma gramínea herbácea tropical pertencente à família *Poaceae*. As partes aéreas das plantas como folha, caule e inflorescência são consideradas fontes de EO e ricas em constituintes químicos bioativos como cariofileno, geraniol, acetato de geranila, linalol, mirceno, limonene, humuleno, selinenos, etc. (Kakaraparthi et al., 2015). O EO da Palmarosa é considerado não tóxico, não sensibilizante e não irritante, sendo utilizado como antimicrobiano, anti-helmíntico, cosmético, de higiene pessoal, farmacêutico, conservante e repelente de mosquitos, e

também como ingrediente em fitoterápicos, chá, bebidas não alcoólicas, sabor em produtos de tabaco (Gupta et al., 2015). A atividade antifúngica da Palmarosa contra fungos fitopatogênicos foi relatada quando encapsulado em nanopartículas (Kalagatur et al., 2018).

Trabalhos avaliando as propriedades biológicas dos EO, como biocompatibilidade e citotoxicidade, são amplamente realizados (Manconi et al., 2018; Murbach Teles Andrade et al., 2014; Ríos et al., 2009). Murbach et al. (2014) evidenciou, em um ensaio MTT de viabilidade celular, que o EO de Palmarosa não afetou a viabilidade de monócitos. Já Fachini-Queiroz et al. (2012) avaliou os efeitos do EO de Tomilho em modelos experimentais de edema de orelha e pleurisia induzida por carragenina, bem como quimiotaxia *in vitro*, demonstrando que o Tomilho apresenta efeitos anti-inflamatórios.

Além de testes a respeito da biocompatibilidade, o efeito antimicrobiano do Tomilho e da Palmarosa foi avaliado por diversos estudos, variando de acordo com as espécies microbianas testadas (Prabuseenivasan et al., 2006; Sakkas & Papadopoulou, 2017; Tardugno et al., 2022; de Oliveira et al., 2021). Gameda et al. (2018) observou a concentração inibitória mínima (MIC) do EO da Palmarosa contra cepas bacterianas e fúngicas isoladas, apresentando atividade biológica superior contra patógenos fúngicos em comparação com bactérias. Em patógenos bacterianos, o EO de Palmarosa mostrou atividade inibitória potencialmente mais alta contra o crescimento de *Streptococcus pyogenes* com MIC de 2,5 µg/ml. Foi constatado também que cepas padrão bacterianas são mais suscetíveis ao EO, em comparação com as clinicamente isoladas. Além disso, há maior eficácia contra bactérias gram positivas do que bactérias gram negativas. Da mesma forma, o EO do Tomilho apresentou maior atividade antimicrobiana contra fungos, seguido das bactérias gram positivas e gram negativas (Cosentino et al., 1999). De Oliveira et al., (2021) avaliou o efeito inibitório e antibiofilme do EO de *Thymus vulgaris*, comprovando os efeitos inibitórios sobre as espécies cariogênicas, mostrando-se capaz de romper biofilmes pré-formados.

Em busca de soluções irrigantes mais citocompatíveis e com outros efeitos terapêuticos como ação anti-inflamatória, principalmente para o tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens e considerando que ainda não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando as emulsões de Tomilho e Palmarosa como agentes irrigantes, o objetivo deste estudo foi avaliar um protocolo de irrigação, contendo como

agente irrigante final as emulsões de Palmarosa e Tomilho, associadas à ativação ultrassônica passiva.

OBJETIVO GERAL

Avaliar um protocolo de irrigação, contendo como agente irrigante final as emulsões de Palmarosa e Tomilho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1: Avaliação *in vivo* da resposta tecidual e capacidade de gerar edema das emulsões de Palmarosa e Tomilho

- Avaliar a resposta tecidual aos implantes subcutâneos contendo as emulsões de Palmarosa e Tomilho, por meio da análise morfológica.
- Avaliar o poder flogógeno das emulsões de Palmarosa e Tomilho na fase aguda da inflamação, através do teste edemogênico.

Artigo 2: Eficácia antimicrobiana das emulsões de Palmarosa e Tomilho em um protocolo final de irrigação no tratamento endodôntico

- Avaliar o efeito *in vitro* do protocolo de irrigação com as emulsões de Tomilho e Palmarosa associadas à ativação ultrassônica passiva sobre biofilme intrarradicular, por meio de microscopia confocal.

Artigo 1

Avaliação *in vivo* da resposta tecidual e capacidade de gerar edema das emulsões de Palmarosa e Tomilho

Marina Tolomei Sandoval Cury¹, Jesse Augusto Pereira², Carlos Roberto Emerenciano Bueno¹, Ana Maria Veiga Vasques, Cristiane Duque², Eloi Dezan-Junior¹

¹ Endodontic Section, Department of Preventive and Restorative Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil.

² Pediatric Section, Department of Preventive and Restorative Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil.

Runnig Title: Avaliação *in vivo* das emulsões de Palmarosa e Tomilho

Keywords: Endodontics, Inflammation, Edema, Thymus Plant, Cymbopogon.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest related to this study.

Corresponding author:

Prof. Eloi Dezan-Junior

Department of Preventive and Restorative Dentistry, Sao Paulo State University (UNESP), Araçatuba School of Dentistry. R: José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, 16015-050, Araçatuba/ São Paulo, Brazil. Tel. number: +55.18.3636.3254, Fax number: +55.18.3636.3236. E-mail address: eloi.dezan@unesp.br

*The manuscript is according to the guide for authors of International Endodontic Journal (<http://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652591/homepage/forauthors.html>)

Resumo

Objetivo

O objetivo foi avaliar *in vivo* a biocompatibilidade e o poder flogógeno das emulsões de *Cymbopogon martinis* e *Thymus vulgaris*.

Metodologia

Para a análise histológica, tubos de polietileno com os extratos foram implantados no dorso de 24 ratos machos Wistar. A análise da cápsula fibrosa e do infiltrado inflamatório foram realizadas após 7, 15 e 30 dias. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%. Para a quantificação do edema, foram utilizados 36 ratos que receberam injeção intravenosa de Azul de Evans 1%. Após 30 minutos, os animais receberam injeção subcutânea na região dorsal de emulsão de Palmarosa ou Tomilho ou soro fisiológico (controle). Os animais foram eutanasiados após 3 e 6 horas, as amostras coletadas, imersas em formamida por 72h e avaliadas por espectrofotometria. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram usados para analisar os dados histológicos, e os resultados do teste edemogênico foram analisados com ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

A diminuição da inflamação foi significativamente melhor após 15 dias do que após 7 dias ($p < 0,01$), não havendo diferença estatística entre as emulsões e o grupo controle ($p > 0,05$). Após 30 dias, a resposta de ambas as emulsões foi semelhante ao controle. O grupo Tomilho induziu maior edema em comparação com o grupo controle em 3 horas, e não mostrou diferença comparado com a Palmarosa. Em 6 horas, ambas as emulsões apresentaram maior edema inflamatório que o grupo controle ($p < 0,05$).

Conclusão

Podemos constatar que as emulsões de Palmarosa e Tomilho são biocompatíveis e geram exsudado inflamatório que intensifica até 6 horas.

Introdução

Durante o tratamento endodôntico, associado à ação mecânica dos instrumentos endodônticos, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigante mais utilizada, por sua capacidade antimicrobiana (Estrela et al., 2012) e de solvente de matéria orgânica, porém irritante para os tecidos (Poggio et al., 2012).

De uma maneira geral, existe uma relação direta entre o poder bactericida e o poder de irritação das substâncias utilizadas para irrigação dos canais radiculares. Isto ocorre porque estas soluções não apresentam seletividade celular. Assim, uma substância capaz de destruir células bacterianas, também destruirá células dos tecidos periapicais, sendo inviável seu uso no tratamento conservador e em casos de dentes com rizogênese incompleta, em que pode ocorrer o extravasamento não intencional da substância na região periapical (Faras et al., 2016).

A inflamação é uma medida protetora para eliminar os estímulos lesivos, sendo que os monócitos têm um papel fundamental na defesa imediata contra agentes estranhos. Os monócitos são células sanguíneas derivadas da medula óssea e precursores de macrófagos nos tecidos lesados. Após a ativação, os monócitos produzem vários mediadores, incluindo citocinas, desempenhando um papel central na imunidade inata e adaptativa (Caldefie-Chezer et al., 2006).

Durante o processo de inflamação, os macrófagos têm um papel fundamental na defesa imediata contra agentes estranhos. Após a ativação com um estímulo inflamatório, como o lipopolissacarídeo (LPS), os macrófagos produzem uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, incluindo prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico (NO) (Geller e Billiar, 1998). A PGE₂ é sintetizada pela enzima limitante de velocidade ciclooxygenase (COX), enquanto o NO é sintetizado pelo óxido nítrico sintase (NOS). A ciclooxygenase existe como duas isoformas principais (COX-1 e COX-2) e uma variante (COX-3). Enquanto a COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tecidos, a COX-2 é uma enzima induzível expressa nas células relacionadas à inflamação, como os macrófagos, que produz grandes quantidades de prostaglandinas. Além disso, os macrófagos ativados por LPS expressam NOS transcricionalmente induzível (iNOS) que produz grandes quantidades de NO a partir de l-arginina. Até o momento, três isoformas de NOS foram identificadas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e iNOS. A alta produção

de NO pela iNOS contribui para a patogênese do choque séptico e doenças inflamatórias (Zamora et al., 2000; Guzik et al., 2003). Portanto, a inibição seletiva de COX-2 e iNOS em macrófagos é uma estratégia útil para triagem de novos anti-inflamatórios.

Na medicina popular, as plantas medicinais e seus compostos derivados isolados são fontes de novos e específicos inibidores do processo inflamatório, e na busca de novos produtos naturais bioativos contra a inflamação, os óleos essenciais (EOs) têm sido cada vez mais estudados como uma rica fonte desses produtos (Sá et al., 2013; Ríos et al., 2009). EOs são misturas complexas de compostos voláteis extraídos de materiais vegetais aromáticos, constituídos principalmente por terpenos modificados que contêm oxigênio na forma de hidroxila, éter, aldeído, cetona ou porções carboxílicas (Bilia et al., 2014).

Uma espécie utilizada nas terapias naturais é o *Cymbopogon martini* (Roxb.) também conhecido como Palmarosa ou Gerânio Indiano, uma gramínea herbácea tropical pertencente à família *Poaceae*, que contém em sua composição os monoterpênicos linalol, geraniol e limonene (Kakaraparthi et al., 2015). É considerado não tóxico, não sensibilizante e não irritante, como evidenciado por Murbach et al. (2014), em um ensaio MTT de viabilidade celular, em que o EO de Palmarosa não afetou a viabilidade de monócitos.

Outro EO amplamente utilizado devido suas excelentes propriedades biológicas é o da planta de tomilho (*Thymus vulgaris*), preparado a partir das folhas e flores pelo método da destilação a vapor, e contendo em sua composição monoterpênicos, como linalol e limonene (Thosar et al., 2018). Fachini-Queiroz et al. (2012) avaliou os efeitos do EO de em modelos experimentais de edema de orelha e pleurisia induzida por carragenina, bem como quimiotaxia *in vitro*, demonstrando que o tomilho apresenta efeitos anti-inflamatórios.

Em busca de soluções irrigantes mais citocompatíveis e com outros efeitos terapêuticos como ação anti-inflamatória, e considerando que ainda não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando as emulsões de Palmarosa e Tomilho como agentes irrigantes finais, a avaliação *in vivo* dessas substâncias se faz necessária.

Objetivos

- 1- Avaliar a resposta tecidual aos implantes subcutâneos contendo as emulsões de Palmarosa e Tomilho, por meio da análise morfológica.

- 2- Avaliar o poder flogógeno das emulsões de Palmarosa e Tomilho na fase aguda da inflamação, através do teste edemogênico.

Material e métodos

O protocolo experimental foi realizado em conformidade com as leis e diretrizes institucionais relevantes, de acordo com os padrões éticos aprovados pelo Comitê de Ética Institucional sobre Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil (Processo FOA nº 0209-2022).

Estimativa da unidade amostral.

O tamanho da amostra foi estimado com base em estudos anteriores (Taveira, 1988; Valentim et al., 2017; Benetti et al., 2020). Considerando o erro do tipo alfa de 0,05, um poder beta de 0,95 e uma razão N2/N1 de 1 foram estipulados, um total de 08 amostras por grupo foi indicado como o tamanho necessário para notar diferenças significativas para a análise morfológica, e um total de 06 amostras por grupo para o teste edemogênico.

Implante subcutâneo - análise morfológica.

Vinte e quatro ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com 4-6 meses de idade, pesando 250-280g, foram utilizados no estudo. Os animais foram alojados em jaulas com temperatura controlada, com água e comida *ad libitum*. Foram preparados 72 tubos de polietileno (Abbott Laboratories do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com estudos anteriores (Cintra et al., 2017; Gomes-Filho et al., 2015; Valentim et al., 2017). As extremidades dos tubos foram preenchidas com esponja hemostática (Hemospon, Maquira Dental Group, Maringá, PR, Brasil), e foram embebidas por gotejamento das emulsões. Para o grupo controle, 24 tubos tiveram as extremidades preenchidas com a esponja hemostática e embebidas em solução salina (NaCl 0,9%).

Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, Brasil) e quetamina (25mg/kg União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil), com injeção intramuscular. Tricotomia manual foi realizada no dorso dos animais e antisepsia obtida com solução de iodo 5%, seguido de uma incisão de 2cm com lâmina de bisturi 15C Bard-Parker (BD, Franklin Lakes, NJ) atingindo o tecido subcutâneo e foi realizada a divulsão, com extensão de

aproximadamente 3cm, em ambos os lados da incisão, com auxílio de uma tesoura de ponta romba. Dois tubos de polietileno contendo as emulsões e um tubo controle foram implantados em cada animal em direções opostas e a pele foi suturada com fio de seda 4.0 (Johnson; Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, Brasil).

Após 7, 15 e 30 dias, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica. Os tubos de polietileno, com os tecidos circundantes, foram removidos e fixados em solução de formalina a 10%, por 48 horas e lavadas em água corrente por 12 horas. Os espécimes foram processados, incluídos em parafina e seccionados em série, em cortes de 5µm para coloração com hematoxilina-eosina.

A análise histológica foi realizada por um único operador calibrado de forma cega sob microscopia de luz (400x, DM 4000 B, Leica, Wetzlar, Alemanha). As reações do tecido na extremidade aberta dos tubos foram classificadas por meio de escores, sendo: 1, poucas células inflamatórias ou nenhuma reação; 2, menos de 25 células e reação leve; 3, entre 25 e 125 células inflamatórias e reação moderada; e 4, 125 ou mais células inflamatórias e reação severa. As cápsulas fibrosas foram consideradas finas quando < 150µm e espessas quando > 150µm (Bueno et al., 2016; Cintra et al., 2017).

Teste edemogênico – reação imediata.

Para a quantificação do edema proporcionada, utilizamos a metodologia descrita por Valentim et al. (2017). Foram empregados 36 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com 4-6 meses de idade, pesando 250-280g, divididos em grupos (n=06) para cada substância utilizada, com períodos experimentais de 03 e 06 horas. Foram avaliadas as emulsões de Tomilho e Palmarosa e o grupo controle, com soro fisiológico.

Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, Brasil) e quetamina (25mg/kg União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil), em injeção intramuscular. Os animais receberam na veia peniana a injeção intravenosa de azul de Evans a 1% (Evans Blue Difco Lab.) aplicada com seringa para insulina (calibre 0,3mm) na proporção de 0,2mL da solução para 100g de massa corporal.

Após 30 minutos da injeção do corante, os animais receberam 0,1mL das emulsões e solução controle avaliadas no tecido conjuntivo da região dorsal (tendo a linha média como referência) e próximo à região caudal, com auxílio de seringas hipodérmicas de 1mL e agulhas 13 x 0,3 descartáveis. Foi injetado apenas um agente irrigante em cada animal. Decorridos os períodos experimentais de 03 e 06 horas, os animais foram

eutanasiados por overdose anestésica, seguido da tricotomia manual da região dorsal dos animais, evidenciando a área de edema, representada por um halo de coloração azul. Com o auxílio de uma tesoura, foi removida a pele dorsal dos animais, com margem de segurança. A padronização das peças removidas foi realizada por meio de um vazador de ferro com 23mm de diâmetro.

As peças padronizadas foram picotadas com tesoura cirúrgica e colocadas em frascos contendo 4mL de formamida (Vetec - Química- RJ – Brasil), permanecendo em estufa a 45°C por 72h para extração do corante. Após esse período, as soluções foram filtradas com auxílio de gaze hidrófila esterilizada e funil de vidro, e recolhidas em frascos apropriados para se proceder à análise em espectrofotômetro.

A leitura do filtrado foi realizada em um espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian), utilizando ondas com comprimento de 630nm, correspondente ao pico máximo de absorção do corante.

Análise estatística

Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram usados para analisar os dados histológicos, e os resultados do teste edemogênico foram analisados com ANOVA e teste de Tukey, usando o software SigmaPlot (Systat V12.0). O nível de significância foi fixado em 95% para todas as análises ($p < 0,05\%$).

Resultados

Subcutâneo – biocompatibilidade

Grupo controle

Um infiltrado inflamatório crônico moderado (escore médio 3) foi observado nos períodos experimentais de 7 e 15 dias [fig. 1 (A, a, B, b)]. A reação inflamatória com linfócitos e macrófagos estava presente, com cápsula fibrosa espessa [fig. 1 (A)] e fina [fig. 1 (B)]. Após 30 dias, [fig. 1 (C)] a cápsula fibrosa apresentou-se delgada, com poucas células inflamatórias.

Tabela 1. Quantidade de amostras em cada grupo categorizadas de acordo com o escore inflamatório, média e espessura da cápsula fibrosa nos quatro períodos experimentais.

	Escore				Média	Cápsula fibrosa
Grupos	1	2	3	4		
7 dias						
Controle	0	2	4	2	3	Espessa
Tomilho	0	0	1	7	4	Espessa
Palmarosa	0	0	1	7	4	Espessa
15 dias						
Controle	1	1	6	0	3	Fina
Tomilho	0	2	6	0	3	Espessa
Palmarosa	0	2	5	1	3	Espessa
30 dias						
Controle	1	4	3	0	2	Fina
Tomilho	0	5	3	0	2	Fina
Palmarosa	0	2	6	0	3	Fina

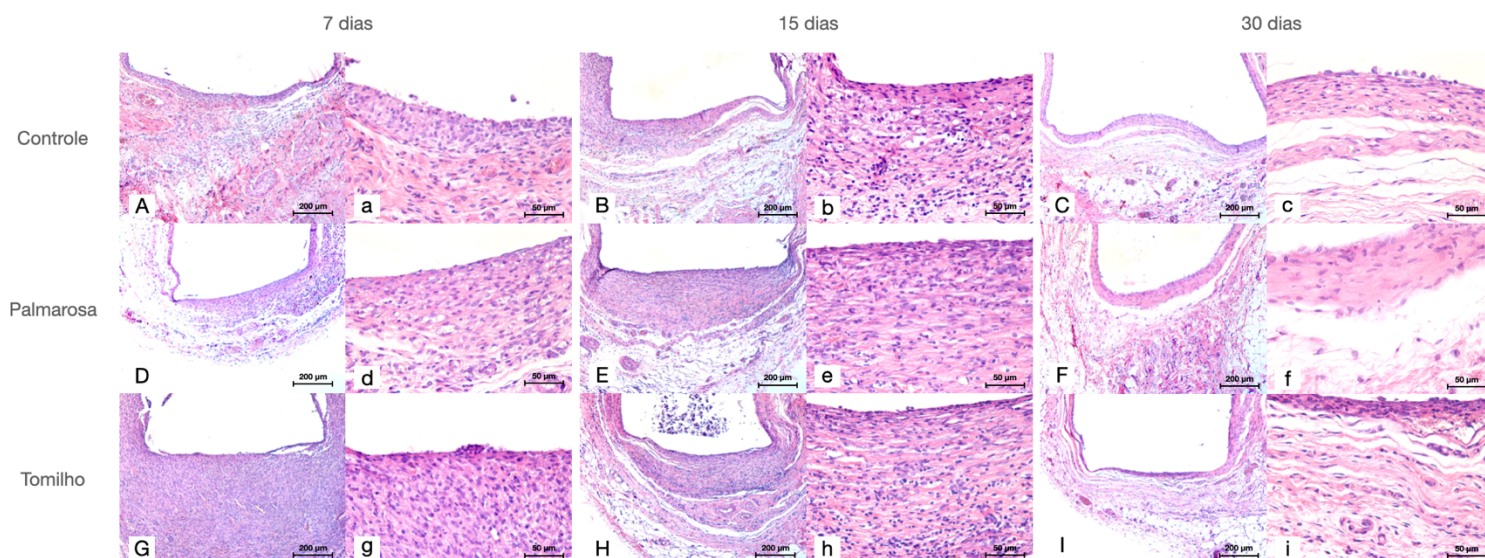


Figura 1 – Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo nos grupos experimentais. Grupo controle (A, a – C, c), aos 7 e 15 dias: cápsula fibrosa espessa (A), fina (B) e reação inflamatória moderada (A, a, B, b); Aos 30: espessura da cápsula fibrosa fina e leve reação inflamatória (C, c). Palmarosa (D, d – F, f); aos 7 e 15 dias: (E, e, F, f) formação de cápsula fibrosa espessa e infiltração severa (d) e moderada (e) de células inflamatórias; Aos 30 dias: (F, f) redução da espessura da cápsula fibrosa e leve infiltrado de células inflamatórias. Tomilho (G, g – I, i), em 7 e 15 dias: (G, g, H, h) infiltração celular severa (g) e moderada (h) e cápsula fibrosa espessa; após 30 dias: (I, i) reação inflamatória leve em cápsula fibrosa fina. Coloração com hematoxilina-eosina. Ampliação original: (A – I) $\times$ 100, (a – i) $\times$ 400

Grupo Palmarosa

Aos 7 dias, o infiltrado inflamatório apresentou-se severo (escore médio 4), sendo considerado moderado a partir de 15 dias (escore médio 3) [fig. 1 (D,d, E, e)]. A intensidade da inflamação manteve-se moderada no período experimental de 30 dias (escore médio 3) [fig. 1 (F,f)]. A cápsula fibrosa próxima à abertura do tubo era espessa em 7 e 15 dias [fig. X (D, E)], tornando-se fina após 30 dias [fig. 1(F)].

Grupo Tomilho

Assim como a emulsão de Palmarosa, a emulsão de Tomilho apresentou, aos 7 dias, infiltrado inflamatório severo (escore médio 4), com cápsula fibrosa espessa [fig. 1 (G,g)]. Após 15 dias, o infiltrado de linfócitos e macrófagos tornou-se moderado, mantendo a cápsula fibrosa manteve-se espessa [fig. 1 (H, h)]. A intensidade da inflamação foi reduzida para leve a partir de 30 dias e a cápsula fibrosa tornou-se fina [fig. 1 (I, i)].

Comparação entre grupos

Os dados foram comparados para cada período de tempo (Tabela 1). Foi possível observar diferença estatística no infiltrado inflamatório, no período de 7 dias, entre os grupos Tomilho e Palmarosa quando comparados com o grupo controle, em que ambas as emulsões geraram maior infiltrado de linfócitos e macrófagos que o grupo controle ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatística na intensidade do infiltrado inflamatório entre as emulsões analisadas e o grupo controle a partir de 15 dias ($p > 0,05$). O escore médio foi moderado em 15 dias, variando de moderado para leve no período de 30 dias. O grupo controle foi o único que apresentou cápsula fibrosa fina a partir de 15 dias [fig. 1 (B, b) e Tabela 1]. A partir de 30 dias, as cápsulas fibrosas de todos os grupos mostraram-se finas [fig. 1 (C, c, F, f, I, i) e Tabela 1].

Edemogênico

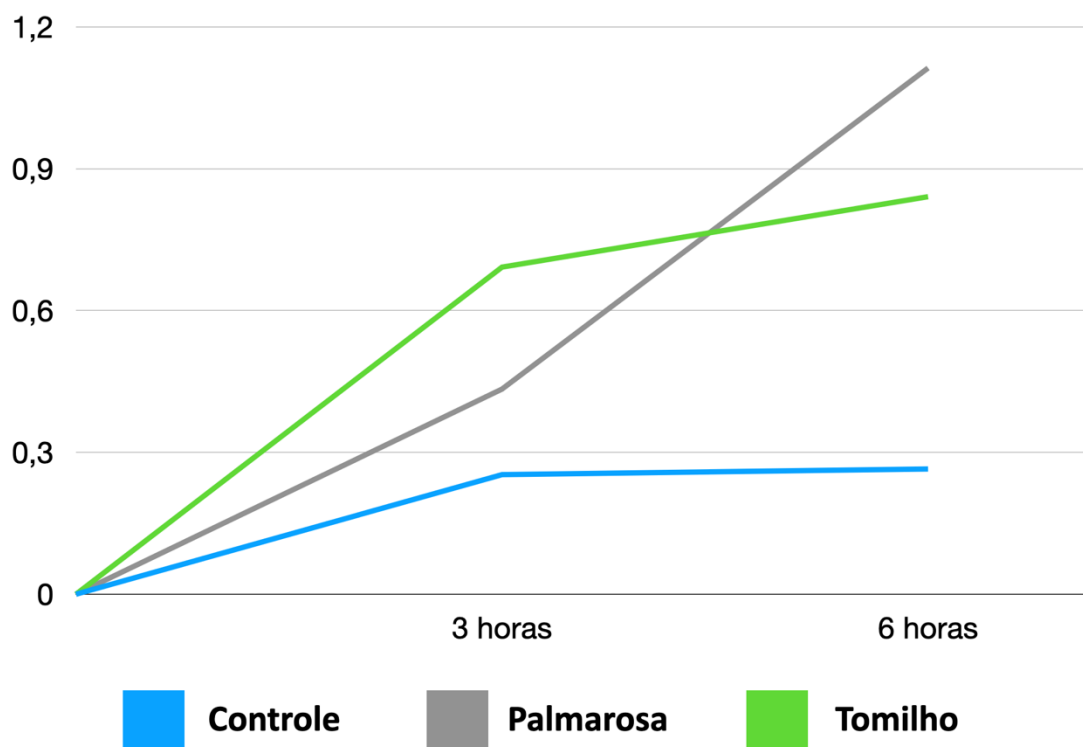
Tabela 2. Valores médios da intensidade do exsudato inflamatório induzido pelas emulsões de Tomilho e Palmarosa e grupo controle, medidos em μg de azul de Evans contido no exsudato.

Grupo*	Tempo	3 horas	6 horas
Controle		0,253 $\pm$ 0,05**	0,265 $\pm$ 0,14
Tomilho		0,692 $\pm$ 0,26	0,841 $\pm$ 0,28
Palmarosa		0,434 $\pm$ 0,19	1,11 $\pm$ 0,45

* Cada grupo corresponde à média de 6 resultados para cada período.

** Desvio padrão.

Gráfico 1. Valores médios da intensidade do exsudato inflamatório induzido pela inoculação subcutânea das emulsões de Tomilho e Palmarosa, medidos em termos de μg de azul de Evans contido no exsudato.



No período de 3 horas houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo Tomilho, que evidenciou maior edema, comparado com o grupo controle. Não foi possível notar diferença estatística entre os grupos Palma Rosa e controle, e Palmarosa e Tomilho ($p > 0,05$).

Para o período experimental de 6 horas, ambas as emulsões apresentaram maior edema inflamatório que o grupo controle. Quando se observa a Tabela 2 e o gráfico 1 nota-se, de maneira geral, que a intensidade do exsudato inflamatório aumentou significativamente com o decorrer do tempo no grupo que recebeu a emulsão de Palmarosa.

Discussão

No teste edemogênico, em condições de normalidade, os vasos sanguíneos, em especial os capilares e vênulas, são permeáveis à água, eletrólitos e pequenas moléculas (Rutberg et al., 1977), ocorrendo um aumento da permeabilidade vascular quando há a injeção subcutânea de emulsão de Tomilho e Palmarosa. O aumento da permeabilidade

vascular produz no local um exsudato inflamatório constituído por líquido rico em água, eletrólitos, macromoléculas e células leucocitárias, que agem no mecanismo de defesa.

O corante azul de Evans, quando realizada injeção intravenosa, liga-se a proteínas plasmáticas, particularmente à albumina, e a presença deste corante nos locais de agressão flogógena permite estimar a intensidade dessa agressão (Rutberg et al., 1977; Valentim et al., 2017).

Tubos de polietileno confeccionados a partir de sondas uretrais são utilizados principalmente no método de implantação subcutânea para análise do processo inflamatório devido a trauma cirúrgico. Utilizar tubos vazios causam poucas reações nos tecidos e não alteram a composição dos materiais utilizados no estudo.

O excelente desempenho do NaOCl está bem documentado na literatura (Bukhary & Balto, 2017; Ma et al., 2011). O NaOCl apresenta capacidade de dissolver matéria orgânica e destruir a matriz extracelular do biofilme, porém uma das consequências clínicas mais sérias do uso de NaOCI é o extravasamento de parte da solução para os tecidos periapicais, causando ulcerações, dor e edema imediatos (Zehnder, 2006). Gomes-Filho et al. (2008) avaliou a resposta inflamatória tecidual da solução de hipoclorito de sódio 2%, e a partir de 30 dias, relatou o início do processo de reparo do tecido conjuntivo, validando sua utilização no tratamento endodôntico.

A análise histológica demonstrou que a reação inflamatória no grupo controle (tubo vazio) foi semelhante à relatada anteriormente, indicando uma menor resposta tecidual causada pelo tubo de polietileno (Bueno et al., 2019). Os maiores escores foram observados nos primeiros períodos experimentais, relacionados com o trauma causado pelo procedimento cirúrgico. As emulsões de Tomilho e Palmarosa mostraram níveis semelhantes de inflamação nos períodos estudados. Devido à diminuição da influência do procedimento cirúrgico no dia 30, uma melhora significativa foi observada na inflamação em todos os grupos.

Os resultados sugerem que a presença de monoterpenos, como o linalol, pouco solúvel em água, presente nas emulsões de Tomilho e Palmarosa, evidencia propriedades de inibir a superexpressão da ciclooxygenase-2 (COX-2) (Pereira et al., 2018). Além disso, o linalol também pode interagir com a enzima óxido nítrico sintase (NOS), inibindo a produção de óxido nítrico (NO) sem reduzir a síntese enzimática (Peana et al., 2008). Segundo Rivot et al. (2002), o NO regula as respostas inflamatórias e imunes contribuindo para a formação de edema, vasodilatação e recrutamento de células imunes

para o local da infecção. No entanto, apesar das descobertas sobre as propriedades bioativas do linalol identificadas até agora, seus efeitos toxicológicos dependerão da dosagem, e as informações toxicológicas ainda são insuficientemente descritas na literatura. Foi notado que as emulsões geraram mais edema que o grupo controle, além de haver aumento significativo do edema no grupo Palmarosa com o decorrer do tempo, evidenciando que a supressão de NO não é imediata e é diretamente proporcional a concentração de linalol.

Além do linalol, outro monoterpeneo presente tanto no Tomilho quanto na Palmarosa é o limonene. Seus derivados, como álcool perílico, mentol, carveol e α -terpineol, são amplamente aplicados em biomateriais devido à suas atividades biológicas especiais e propriedades físico-químicas favoráveis (Thomsett et al., 2019), mesmo o sendo um irritante moderado da derme, dos olhos e do trato respiratório superior. Por ser uma molécula sensível ao oxigênio, forma hidroperóxidos que se degradam rapidamente e formam numerosos alérgenos potentes, incluindo álcool perílico e acetato de carveol. (Ciriminna et al., 2014), além de estimular a produção de NO, favorecendo a formação de edema (Del Toro-Arreola et al., 2005), informação essa que explica a presença de edema no primeiro período experimental.

Outro monoterpeneo, o geraniol, presente na emulsão de Palmarosa, estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), prevenindo e limitando as reações imunes específicas e inespecíficas, e contribui para a tolerância tecidual (Sabat et al., 2010). Sinha et al. (2014) revelou em estudo que o geraniol não apresenta qualquer genotoxicidade, sugerindo sua segurança em baixa concentração para consumo humano.

Tanto a emulsão de Tomilho, quanto a emulsão de Palmarosa, apresentaram reação inflamatória exacerbada ao grupo controle, porém, com o decorrer dos períodos experimentais, demonstraram melhora no processo de reparo, demonstrando ser biocompatíveis. Mesmo com resultados promissores, ainda não há motivos suficientes para utilizar as emulsões de Tomilho e Palmarosa em um protocolo final de irrigação. Para sedimentar o uso de Eos na endodontia, mais pesquisas são necessárias.

Conclusão

Com base nas metodologias utilizadas e nos resultados obtidos, podemos constatar que as emulsões de Palmarosa e Tomilho são biocompatíveis a longo prazo, porém geram edema inflamatório imediato.

Referências

- Benetti, F., Bueno, C.R.E., Reis-Prado, A.H.D., Souza, M.T., Goto, J., Camargo, J.M.P., Duarte, M.A.H., Dezan-Júnior, E., Zanutto, E.D., Cintra, L.T.A. (2020) Biocompatibility, Biomineralization, and Maturation of Collagen by RTR®, Bioglass and DM Bone® Materials. *Brazilian Dental Journal*, 31, 477-484.
- Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C. (2014) Essential Oils loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 651593.
- Bueno, C.R.E., Lopes, G.A., Valentim, D., Marques, V.A.S., Vasques, A.M.V., Cury, M.T., Sivieri-Araujo, G., Jacinto, R.D.C., Cintra, L.T.A., Dezan-Junior, E. (2017) Mixing failures of endodontic sealers: an in vivo biocompatibility study. *Brazilian Dental Science*, 20, 85–92.
- Bueno, C.R.E., Valentim, D., Marques, V.A.S., Gomes-Filho, J.E., Cintra, L.T., Jacinto, R.C., Dezan-Junior, E. (2016) Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. *Brazilian Oral Research*, 30, S1806.
- Bueno, C.R.E., Vasques, A.M.V., Cury, M.T.S., Sivieri-Araújo, G., Jacinto, R.C., Gomes-Filho, J.E., Cintra, L.T.A., Dezan-Júnior, E. (2019) Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clinical Oral Investigations*, 23, 169-177.
- Bukhary, S., Balto, H. (2017) Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics*, 43, 643–647.
- Caldefie-Chézet, F., Fusillier, C., Jarde, T., Laroye, H., Damez, M., Vasson, M.P., Guillot, J. (2006) Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy research*, 20, 364-370.
- Cintra, L.T.A., Benetti, F., Queiroz, I.O.A., Lopes, J.M.A., Oliveira, S.H.P., Sivieri-Araujo, G., Gomes-Filho, J.E. (2017) Cytotoxicity, bio- compatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *Journal of Endodontics*, 43, 774–778.

- Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Carà, P.D., et al., (2014) Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical. Communications*, 50, 15288–15296.
- De Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L.N., & de Souza, D.P. (2013) A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18, 1227–1254.
- Del Toro-Arreola, S., Flores-Torales, E., Torres-Lozano, C., Del Toro-Arreola, A., Tostado-Pelayo, K., Guadalupe Ramirez-Dueñas, M., Daneri-Navarro, A. (2005) Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *International Immunopharmacology*, 5, 829-838.
- Estrela, C., Sousa-Neto, M.D., Alves, D.R., Alencar, A.H., Santos, T.O., Pecora, J.D. (2012) A preliminar study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. *Brazilian Dental Journal*, 23, 645-653.
- Fachini-Queiroz, F.C., Kummer, R., Estevão-Silva, C.F., Carvalho, M.D., Cunha, J.M., Grespan, R., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K. (2012) Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–10.
- Faras, F., Abo-Alhassan, F., Sadeq, A., Burezq, H. (2016) Complication of improper management of sodium hypochlorite accident during root canal treatment. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6, 493-496.
- Geller, D.A., Billiar, T.R. (1998) Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Reviews*, 17, 7-23.
- Gomes-Filho, J.E., Aurélio, K.G., Costa, M.M., Bernabé, P.F. (2008) Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *Journal Applied Oral Science*, 16, 137-144.
- Gomes-Filho, J.E., de Azevedo Queiroz, I.O., Watanabe, S., da Silva Santos, L.M., Lodi, C.S., Okamoto, R., Ervolino, E., Dezan, E. Jr., Cintra, L.T.A. (2015) Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dental Traumatology*, 31, 67-72.
- Guzik, T.J., Korb, R., Adamek-Guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469-487.
- Kakaraparthi, P.S., Srinivas, K.V.N.S., Kumar, J.K., Kumar, A.N., Rajput, D.K., Anubala, S. (2015) Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 69, 348–354.

- Ma, J., Wang, Z., Shen, Y., Haapasalo, M. (2011) A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Endodontics*, 37, 1380–1385.
- Murbach Teles Andrade, B.F., Conti, B.J., Santiago, K.B., Fernandes Júnior, A., Sforcin, J.M. (2014) *Cymbopogon martini* essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/ anti-inflammatory effects in human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66, 1491–1496.
- Peana, A.T., Moretti, M.D.L., Watson, R., Preedy, V. (2008) Linalool in Essential Plant Oils: Pharmacological Effects. *Botanical Medicine in Clinical Practice*, 10, 716-724.
- Pereira, I., Severino, P., Santos, A.C., Silva, A.M., Souto, E.B. (2018) Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 171, 566-578.
- Poggio, C., Colombo, M., Scribante, A., Sforza, D., Bianchi, S. (2012) *In vitro* antibacterial activity of diferente endodontic irrigants. *International Association for Dental Traumatology*, 28, 205-209.
- Ríos, J.L., Recio, M.C., Escandell, J.M., Andújar, I. (2009) Inhibition of transcription factors by plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1212–1237.
- Rivot, J.P., Montagne-Clavel, J., Besson, J.M. (2002) Subcutaneous formalin and intraplantar carrageenan increase nitric oxide release as measured by *in vivo* voltammetry in the spinal cord. *European Journal of Pain*, 6, 25-34.
- Rutberg, M., Spangberg, E., Spangberg, L. (1977) Evaluation of enhanced vascular permeability of endodontic medicaments in vivo. *Journal of Endodontics*, 3, 347-351.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J. (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21, 331-44.
- Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., Mukherjee, A. (2014) Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 71–77.
- Taveira, L.A.A. (1988) Estudo do poder flogógeno da placa dental íntegra e tratada com diferentes soluções extratoras. 152f. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia, Bauru.

- Thomsett, M.R., Moore, J.C., Buchard, A.B., Stockman, R.A., Howdle, S.M. (2019) New renewably-sourced polyesters from limonene-derived monomers. *Green Chemistry*, 21, 149–156.
- Valentim, D., Bueno, C.R.E., Marques, V.A.S., Vasques, A.M.V., Cury, M.T.S., Cintra, L.T.A., Dezan-Junior, E. (2017) Calcium hydroxide associated with a new vehicle: Psidium cattleianum leaf extracts. Tissue response evaluation. *Brazilian Oral Research*, 31,1-8.
- Zamora, R., Vodovotz, Y., Billiar, T.R. (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine*, 6, 347-373.
- Zehnder, M. (2006) Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, 32, 389–398.

Artigo 2

Eficácia antimicrobiana das emulsões de Palmarosa e Tomilho em um protocolo final de irrigação no tratamento endodôntico

Marina Tolomei Sandoval Cury¹, Jesse Augusto Pereira², Carlos Roberto Emerenciano Bueno¹, Ana Maria Veiga Vasques, Cristiane Duque², Eloi Dezan-Junior¹

¹ Endodontic Section, Department of Preventive and Restorative Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil.

² Pediatric Section, Department of Preventive and Restorative Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil.

Runnig Title: Avaliação *in vitro* das emulsões de Palmarosa e Tomilho

Keywords: Endodontics, Disinfection, Emulsions, Thymus Plant, Cymbopogon.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest related to this study.

Corresponding author:

Prof. Eloi Dezan-Junior

Department of Preventive and Restorative Dentistry, Sao Paulo State University (UNESP), Araçatuba School of Dentistry. R: José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, 16015-050, Araçatuba/ São Paulo, Brazil. Tel. number: +55.18.3636.3254, Fax number: +55.18.3636.3236. E-mail address: eloi.dezan@unesp.br

*The manuscript is according to the guide for authors of International Endodontic Journal (<http://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652591/homepage/forauthors.html>)

Resumo

Objetivo

Avaliar *in vitro* um protocolo de irrigação com as emulsões de *Cymbopogon martinis* e *Thymus vulgaris* associadas à ativação ultrassônica passiva sobre biofilme intrarradicular.

Metodologia

A análise por cromatografia gasosa avaliou os componentes dos EOs. Para a avaliação antibiofilme, incisivos centrais e laterais inferiores tiveram seus canais preparados biomecanicamente com Reciproc R25, padronizados em 12cm de comprimento, esterilizados e contaminados com biofilme misto obtido a partir de cepas planctônicas de *E. faecalis*, *S. mutans*, *A. israeli*, *L. casei* e *F. nucleatum*. Os protocolos de irrigação foram realizados com Hipoclorito de sódio 1%, soro, Palmarosa e Tomilho associados à ativação ultrassônica passiva, analisados em microscopia confocal após 5 minutos e 48 horas. Os resultados foram analisados com ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Os principais constituintes do EO de Tomilho foram timol, cymene, linalol e carvacrol. Por outro lado, geraniol e acetato de geranila e linalol foram os componentes mais predominantes na Palmarosa, representando 93,79% do EO. A análise quantitativa evidenciou que o hipoclorito de sódio 1% foi a solução mais potente em inibir biofilme intrarradicular em 5 minutos ($p < 0,05$). Ambas as emulsões apresentaram atividade antibiofilme em 5 minutos semelhante ao hipoclorito em 48h ($p > 0,05$), reduzindo o potencial antimicrobiano em 48 horas.

Conclusão

As emulsões de Palmarosa e Tomilho apresentaram atividade antimicrobiana significativa quando utilizadas em um protocolo final de irrigação, mas foram menos efetivos que o hipoclorito de sódio.

Introdução

Doenças pulpare e periapicais ocorrem como resultado da invasão bacteriana na dentina e no sistema de canais radiculares dos dentes afetados (Ma et al., 2011), sendo o principal objetivo do tratamento endodôntico a eliminar da maior quantidade possível de microrganismos do sistema de canais radiculares e dentina infectada. O preparo biomecânico dos canais radiculares combinado com as propriedades físico-químicas das soluções irrigadoras e medicação intracanal, promove a redução do número de bactérias, favorecendo o reparo periapical (Zancan et al., 2018).

Associado à ação mecânica dos instrumentos endodônticos, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigadora mais utilizada mundialmente, por sua capacidade antimicrobiana (Estrela et al., 2012) e de dissolver matéria orgânica (Poggio et al., 2012). A eliminação de microrganismos é diretamente proporcional a concentração de cloro livre utilizado durante a irrigação que, por sua vez, depende da concentração de ácido hipocloroso, causando um efeito bactericida por oxidação e hidrólise de grupos sulfuretos de enzimas localizadas nas membranas bacterianas e citoplasma (Siqueira et al., 1998). Entretanto, o tamponamento da solução em meio muito alcalino, apesar de favorável no ponto de vista da estabilidade da solução, não é aconselhável no uso, visto que o emprego de uma solução com teor de cloro livre mais elevado, não necessariamente apresentará ação mais desinfetante, visto que a ação do hipoclorito depende também do pH, sendo mais eficaz em meio mais ácido (Paiva et al., 1989).

A irrigação convencional com seringa e agulha é a técnica mais realizada mundialmente, porém não é totalmente eficaz no terço apical do canal radicular devido sua complexa anatomia, que pode abrigar bactérias, dificultando a ação de instrumentos e irrigantes, uma vez que mesmo após o preparo biomecânico e irrigação com hipoclorito de sódio, independentemente da concentração, há permanência de bactérias (Siqueira & Rôças, 2008; Shin et al., 2010). As soluções irrigadoras devem ser levadas em contato direto com toda a parede do canal para uma ação efetiva (Heard & Walton, 1997), e um protocolo final de irrigação é essencial para o sucesso do tratamento endodôntico (Zehnder, 2006).

A irrigação ultrassônica passiva (PUI), descrita inicialmente por Weller et al. (1980), é um recurso para ativação das soluções irrigantes com uso de um inserto acionado por ultrassom, induzindo a formação de cavitações e ondas acústicas e quando utilizado na solução de NaOCl, é capaz de remover uma quantidade maior de detritos,

bactérias e tecido pulpar necrótico de áreas do canal radicular com anatomia complexa (Rodig et al., 2010; Vivan et al., 2016). No entanto, bactérias resistentes podem permanecer viáveis no interior do sistema de canais radiculares, colonizando os túbulos dentinários em uma profundidade de 200 a 300 µm, tornando-se inacessíveis (Horiba et al., 1990). Além disso, alguns microrganismos isolados como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*. e *Streptococcus sanguinis* podem sobreviver à irrigação com hipoclorito de sódio enquanto desenvolve tolerância alcalina e resistência a antibióticos e clorexidina (Cieplik et al., 2019; Jungermann et al., 2011; Kitagawa et al., 2016; Wang et al., 2017).

Tendo em vista esta limitação, há uma necessidade de encontrar novos agentes irrigantes para potencializar a desinfecção do sistema de canais radiculares, em um protocolo final de irrigação, disponibilizando condutas aplicáveis e funcionais para o tratamento de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica (Duncan & Izzo 2005).

Dentre os produtos naturais pesquisados para aplicações na odontologia estão os óleos essenciais (EOs), amplamente propostos como antimicrobianos naturais, principalmente por serem ricos em terpenos, considerados metabólitos secundários, com conhecidos efeitos bacteriostáticos, bactericidas, propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, principalmente os terpenos modificados que contêm oxigênio na forma de hidroxila, éter, aldeído, cetona ou porções carboxílicas (Pereira et al., 2018).

Um desses EOs é o da planta de tomilho (*Thymus vulgaris*), preparado a partir das folhas e flores pelo método da destilação a vapor. O EO de tomilho é útil em condições como: alívio de gastrite e enterocolite, candidíase oral, infecções respiratórias, tratamento de inchaços causados por gota ou problemas reumáticos, dores nas costas e nas articulações (Thosar et al., 2018), sendo um dos 10 EOs mais comercializados ao redor o mundo, uma vez que é usado como conservante natural de alimentos, apresenta efeito antioxidante, antibacteriano e antifúngico considerável (Ben-Jabeur et al., 2015). O EO de *T. vulgaris* pode conter até 30 monoterpenos, resultando em uma composição química diversa dos EOs derivados de plantas da mesma espécie, levando a diferentes quimiotipos, sendo os predominantes linalol e limonene.

Outra espécie utilizada nas terapias naturais é o *Cymbopogon martini* (Roxb.) também conhecido como Palmarosa ou Gerânio Indiano, uma gramínea herbácea tropical

pertencente à família *Poaceae*. As partes aéreas das plantas como folha, caule e inflorescência são consideradas fontes de EO e ricas em constituintes químicos bioativos como cariofileno, geraniol, acetato de geranila, linalol, mirceno, limonene, humuleno, selinenos, etc. (Kakaraparthi et al., 2015). O EO da Palmarosa é considerado não tóxico, não sensibilizante e não irritante, sendo utilizado como antimicrobiano, anti-helmíntico, cosmético, de higiene pessoal, farmacêutico, conservante e repelente de mosquitos, e também como ingrediente em fitoterápicos, chá, bebidas não alcoólicas, sabor em produtos de tabaco (Gupta et al., 2015). A atividade antifúngica da Palmarosa contra fungos fitopatogênicos foi relatada quando encapsulado em nanopartículas (Kalagatur et al., 2018).

Em busca de soluções com ação antimicrobiana, principalmente para o tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens, e considerando que ainda não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando as emulsões de Tomilho e Palmarosa como agentes irrigantes, o objetivo deste estudo foi avaliar um protocolo de irrigação, contendo como agente irrigante final as emulsões de Palmarosa ou Tomilho, associada à ativação ultrassônica passiva.

Objetivo

Avaliar o efeito *in vitro* do protocolo de irrigação com as emulsões de Tomilho e Palmarosa associadas à ativação ultrassônica passiva sobre biofilme intrarradicular, por meio de microscopia confocal.

Material e métodos

Para este trabalho foram avaliados os seguintes compostos: hipoclorito de sódio 1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, EUA), Tomilho (EO de *Thymus vulgaris*, WNF ind e com. Ltda, Casa Verde, São Paulo, Brasil) (Lote: 04967/20) e PalmaRosa (EO de *Cymbopogon martini*, WNF ind e com. Ltda, Casa Verde, São Paulo, Brasil) (Lote: 00152/21). As emulsões foram obtidas da mistura de 900 µl de goma xantana com 100 µl do EO da Palmarosa ou do Tomilho.

Cromatografia de massa gasosa

Utilizamos um cromatógrafo a gás Shimadzu QP 2010 acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS) utilizando uma coluna capilar Rxi®-5ms, Restek (30 cm x 0,25 mm x 0,25 µm) e velocidade linear do gás hélio de 36,3 cm/s. A temperatura de injeção foi fixada em 240 °C. A temperatura inicial programada foi de 50°C por 1,5 min, seguido de aquecimento a uma taxa de 4 °C por minuto até 200 °C, 10 °C por minuto até 240 °C, que foi mantida por 10 minutos e 10 °C por minuto até 280 °C, que foi mantida por 5 minutos. As amostras dos EOs foram diluídas 50 vezes em hexano cromatográfico e injetadas (1 µL) no cromatógrafo em modo split (1-50).

A identificação dos constituintes baseou-se na comparação dos tempos de retenção com os de amostras autênticas, comparando os índices de retenção linear relativos a uma série de n-hidrocarbonetos de Sigma-Aldrich (C7–C30) usando a equação de Van den Dool e Kratz (Babushok et al.2011), e usando bases de dados comerciais (WILEY8 e FFNSC1.3) para a análise de espectros de massa. As proporções relativas dos compostos principais foram obtidas por normalização da área dos picos.

Avaliação da atividade antibiofilme dos protocolos de irrigação

Estimativa da unidade amostral.

O tamanho da amostra foi estimado com base em estudo anterior (Andrade et al., 2015). Considerando o erro do tipo alfa de 0,05, um poder beta de 0,95 e uma razão N2/N1 de 1 foram estipulados, um total de 08 amostras por grupo foi indicado como o tamanho necessário para notar diferenças significativas.

Preparo dos espécimes de dentina radicular humana

Esta parte do estudo foi realizada de acordo com metodologia proposta por Andrade et al. (2015), com algumas modificações. Foram incluídos 32 incisivos centrais e laterais permanentes inferiores hígidos, indicados para extração na clínica de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilo Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. As superfícies radiculares externas foram desbridadas com uma cureta e os dentes permaneceram inseridos em solução de hipoclorito de sódio 1% por 48h para desinfecção e estocados em solução salina. Após abertura coronária, uma lima k#15 foi introduzida no canal até a ponta ser observada na embocadura do forame radicular, e dessa medida foi subtraído 1mm para obtenção do comprimento de trabalho. O preparo biomecânico dos canais radiculares foi realizado com Reciproc R25 (VDW, Munique,

Alemanha) no comprimento de trabalho, utilizando solução salina como irrigante. Dentes com os canais muito amplos, com canais bifurcados ou com ápice aberto foram descartados. As coroas foram removidas usando um disco diamantado a 250 rpm, sob irrigação usando uma máquina de corte Isomet (Isomet Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e o comprimento das raízes foi padronizado em 12mm, removendo em média 5mm apical. A parte inorgânica da smear layer foi removida com EDTA 17% por 5 min em banho ultrassônico, e em seguida, os canais foram lavados com água. Os espécimes foram autoclavados a 121° C por 20min. Os espécimes foram inseridos microtubos de 2mL com a parte da embocadura dos canais para cima. Quaisquer “gaps” entre o espécime e a parede interna do microtubo foi selada com resina composta e essa será polimerizada por 20s.

Contaminação dos espécimes de dentina radicular humana

Primeiramente, 800 uL de caldo BHI com hemina e menadiona foi inserido em cada microtubo contendo os espécimes de dentina e a ativação foi realizada em banho ultrassônico para permitir a entrada do meio de cultura nos túbulos dentinários. A infecção da dentina foi realizada com a cultura de um biofilme misto obtido a partir de cepas planctônicas de *E. faecalis*, *S. mutans*, *A. israeli*, *L. casei* e *F. nucleatum*. Quinhentos microlitros dessa cultura foram inseridos nos microtubos contendo os espécimes de dentina radicular humana e então foram centrifugados em 1400xg, 2000xg, 3600xg e 5600xg a 25° C, duas vezes cada, por 5 min, com renovação da cultura a cada centrifugação (Ma et al., 2011). Todos os microtubos foram incubados a 37° C em caldo BHI contendo hemina e menadiona por 21 dias. A cada dois dias, o meio de cultura foi renovado e os microtubos centrifugados a 3600xg por 5 min a 25° C e incubados novamente a 37° C. Ao final desse período, os espécimes de dentina foram removidos do microtubo e lavados com água estéril por 1min. Após as 3 semanas de contaminação, os espécimes foram lavados com soro fisiológico e aderidos no fundo de um poço de placa de 24 poços com fita estéril.

Tratamento dos espécimes de dentina radicular humana

Foi realizado 2 ciclos de irrigação com 5ml de hipoclorito de sódio 1% durante 1 minuto seguido de aspiração, irrigação com soro fisiológico estéril por 1 minuto seguido de aspiração, EDTA 17% por 2 minutos, irrigação com soro fisiológico estéril por 2 minutos seguido de aspiração. Os espécimes foram randomizados e divididos nos grupos:

Hipoclorito de sódio 1%, soro, Palmarosa e Tomilho. Em todos os grupos as soluções e emulsões permaneceram em contato com os espécimes por 5 minutos, sendo 1 minuto de PUI, seguido de irrigação com soro fisiológico e aspiração. A análise foi realizada nos períodos imediato e após 48 horas. Para a análise de 48 horas, após a irrigação com soro e secagem, os espécimes foram preenchidos com propilenoglicol e mantidos em estufa de CO₂ até o momento da análise.

Análise dos espécimes em microscopia confocal

A análise em Microscopia Confocal foi realizada na Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP. Após os tratamentos, os espécimes foram lavados com água destilada e seccionados longitudinalmente, seguido de uma secção transversal com um disco diamantado, sob irrigação com soro fisiológico. Os espécimes foram imersos em EDTA 17% por 3min para remover resíduos de smear layer. Cada espécime de dentina foi corado com o corante fluorescente LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability stain (Molecular Probes, Eugene, OR) contendo SYTO 9 e propidium iodide, de acordo com as instruções do fabricante e então, lavados com solução salina por 1 min. Os comprimentos de excitação/emissão foram 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635nm para propidium iodide. Dois espécimes não infectados foram corados com o mesmo protocolo e usados como controle negativo. A fluorescência das células coradas foi avaliada em microscopia confocal (Leica TCS SP5, Microsystems GmbH) e as imagens adquiridas pelo software LAS AF Leica Microsystems usando a resolução de 1024x1024 pixels. Quatro áreas aleatórias foram obtidas para cada amostra com uma lente de óleo 40x. A proporção de células mortas foi determinada pela contagem de células mortas (coradas em vermelho) sobre a contagem total de células (vivas – em verde + mortas – em vermelho) utilizando o programa Image J.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com ANOVA e teste de Tukey, usando o software SigmaPlot (Systat V12.0), com nível de significância estabelecido em 5%.

Resultados

Cromatografia de massa gasosa

A análise química revelou que ambos os EO eram abundantes em monoterpenos. Os principais constituintes do EO de *Thymus vulgaris* foram timol, cymene, linalol e carvacrol, contribuindo juntos para o teor total do EO com 82%. Por outro lado, geraniol e acetato de geranila e linalol foram os componentes mais predominantes na *Cymbopogon martini*, representando 93,79 % do EO total (tabela 3 e gráficos 1, 2).

Tabela 1. Determinação por cromatografia gasosa do EO de *Cymbopogon Martini*

Número pico da amostra	Alcanos (n. C) e nome composto da amostra	TR (min)	Ikc	% área
	8 *	4,835		
1	3-Hexen-1-ol	6,197	852,064	0.15
	9	7,451		
2	Myrcene	10,460	990,851	0.09
	10	10,763		
3	Limonene	11,817	1029,310	0.05
4	Ocimene <(Z)-. beta->	12,116	1037,625	0.16
5	Ocimene <(E)-. beta->	12,492	1048,081	1.19
6	Linalool	14,348	1099,694	2.10
	11	14,359		
	12	17,950		
7	Nerol	18,961	1229,220	0.34
8	Neral	19,404	1242,023	0.29
9	Geraniol	19,992	1259,017	67.72
10	Geranial	20,441	1271,994	0.73
	13	21,410		
11	Geranyl acetate	24,209	1385,050	23.97
	14	24,701		
12	Caryophyllene <(E)->	25,527	1426,474	1.47
	15	27,821		
13	Geranyl butyrate	29,634	1561,291	0.34
14	Nerolidol, (E)-	29,773	1565,991	0.06
15	(-)-beta-caryophyllene oxide	30,531	1591,616	0.05
	16	30,779		
16	Farnesol <(Z,Z)->	34,238	1723,316	0.40
	17	33,584		
17	Geraniol hexanoate	35,062	1755,397	0.89
	18	36,252		

* Informações do mix de alcanos injetados no mesmo método da amostra

TR: tempo de retenção (min)

Ikc: índice de Kovats calculado

Ikt: índice tabelado

Gráfico 1. Cromatograma do EO de *Cymbopogon martini*

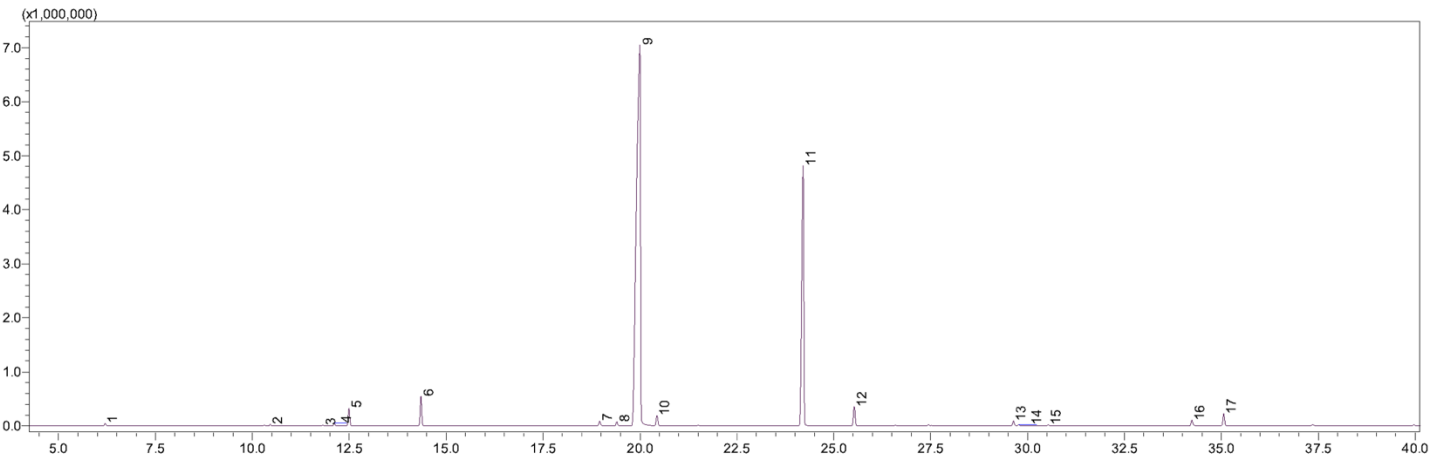
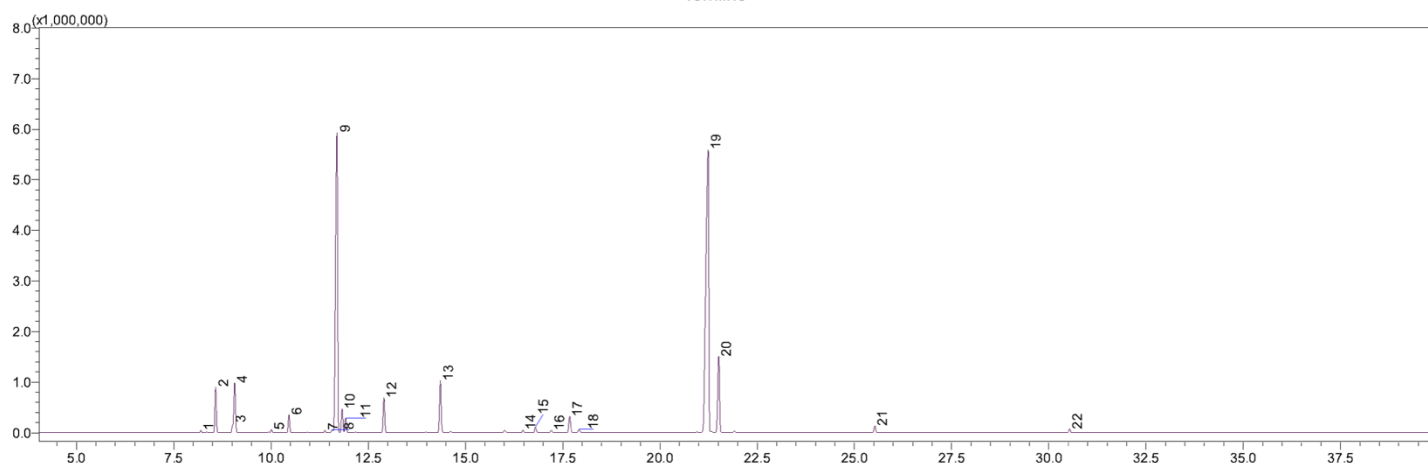


Tabela 2. Determinação por cromatografia gasosa do EO de *Thymus vulgaris*

Número pico da amostra	Alcanos (n. C) e nome composto da amostra	TR (min)	lkc	% área
	8 *	4,835		
	9	7,451		
1	CYCLOHEXENE. 1-METHYL-4-(1-METHYLETHENYL)-	8,201	922,645	0.13
2	Pinene <alpha->	8,578	934,028	3.38
3	Fenchene <alpha->	9,025	947,524	0.11
4	Camphene	9,068	948,822	3.19
5	Pinene <beta->	10,013	977,355	0.18
6	Myrcene	10,466	991,033	1.31
	10	10,763		
7	1.3-CYCLOHEXADIENE. 1-METHYL-4-(1-METHYLETHYL)-	11,389	1017,408	0.15
8	BENZENE. METHYL(1-METHYLETHYL)-	11,567	1022,358	0.21
9	Cymene <para->	11,697	1025,973	30.96
10	Limonene	11,829	1029,644	1.89
11	Eucalyptol	11,920	1032,175	1.11
12	Terpinene <gamma->	12,905	1059,566	2.84
13	Linalool	14,358	1099,972	4.23
	11	14,359		
14	Isoborneol	16,483	1159,148	0.19
15	2-BORNANOL	16,801	1168,003	0.49
16	Terpinen-4-ol	17,210	1179,393	0.18
17	3-CYCLOHEXENE-1-METHANOL. .ALPHA...ALPHA..4-TRIMETHYL-	17,679	1192,453	1.53
18	Terpineol <gamma->	17,922	1199,220	0.27
	12	17,950		
19	Thymol	21,236	1294,971	40.09
	13	21,410		
20	Carvacrol	21,513	1303,130	6.72
	14	24,701		
21	Caryophyllene <(E)->	25,527	1426,474	0.56
	15	27,821		
22	Caryophyllene oxide	30,536	1591,785	0.28
	16	30,779		

* Informações do mix de alcanos injetados no mesmo método da amostra

TR: tempo de retenção (min)
lkc: índice de Kovats calculado
lkt: índice tabelado

Gráfico 2. Cromatograma do EO de *Thymus vulgaris*

Avaliação da atividade antibiofilme dos protocolos de irrigação

A tabela 3 apresenta as porcentagens médias de células mortas no biofilme após contato com as emulsões de Tomilho, Palmarosa, hipoclorito de sódio 1% e soro.

O soro foi a solução com menor atividade antimicrobiana observada quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$), não demonstrando diferença estatística nos dois períodos de análise ($p > 0,05$) (gráfico 3 e fig. D, H).

O protocolo final de irrigação com NaOCl analisado em 5 minutos demonstrou maior capacidade de remover biofilme das superfícies dentinárias com a maior proporção de células mortas encontradas quando comparado aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$) (gráfico 3 e fig. A, E), diminuindo seu poder bactericida em 48 horas.

Tanto a emulsão de Tomilho quanto a emulsão de Palmarosa, no período de análise de 5 minutos, apresentaram atividade antimicrobiana semelhante ao hipoclorito de sódio 1% analisado após 48 horas ($p > 0,05$). Não houve diferença estatística entre as emulsões, na análise de 48 horas ($p > 0,05$), e ambas demonstraram diminuição na atividade antimicrobiana quando comparadas ao hipoclorito de sódio no mesmo período de análise ($p < 0,05$) (gráfico 3 e fig. B, C, F, G).

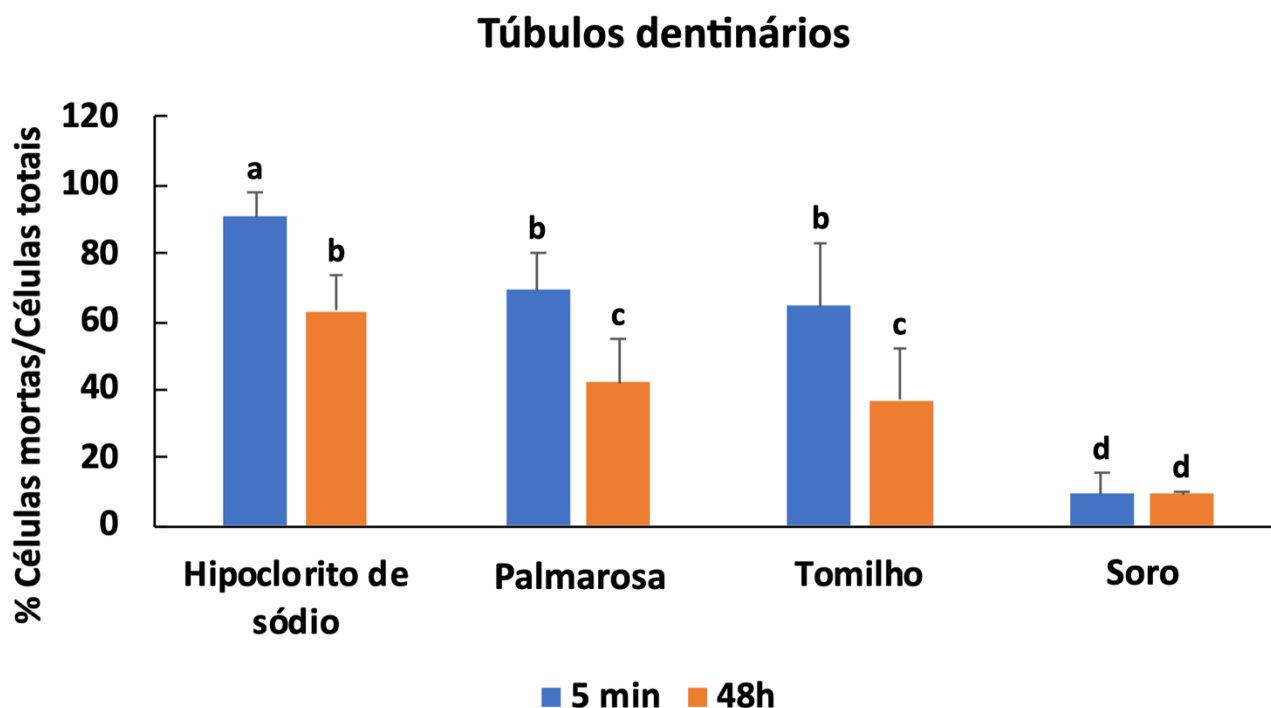
Tabela 3. Valores médios da porcentagem de células mortas sobre a contagem total de células

Grupo*	Tempo	
	5 minutos	48 horas
Hipoclorito de sódio	90,807 $\pm$ 6,738**	63,001 $\pm$ 11,086
Palmarosa	69,382 $\pm$ 10,623	42,134 $\pm$ 12,932
Tomilho	64,652 $\pm$ 18,232	37,031 $\pm$ 15,495
Soro	9,386 $\pm$ 6,524	9,794 $\pm$ 0,622

* Cada grupo corresponde à média de 4 resultados para cada período.

** Desvio padrão.

Gráfico 3. Valores médios da porcentagem de células mortas sobre a contagem total de células



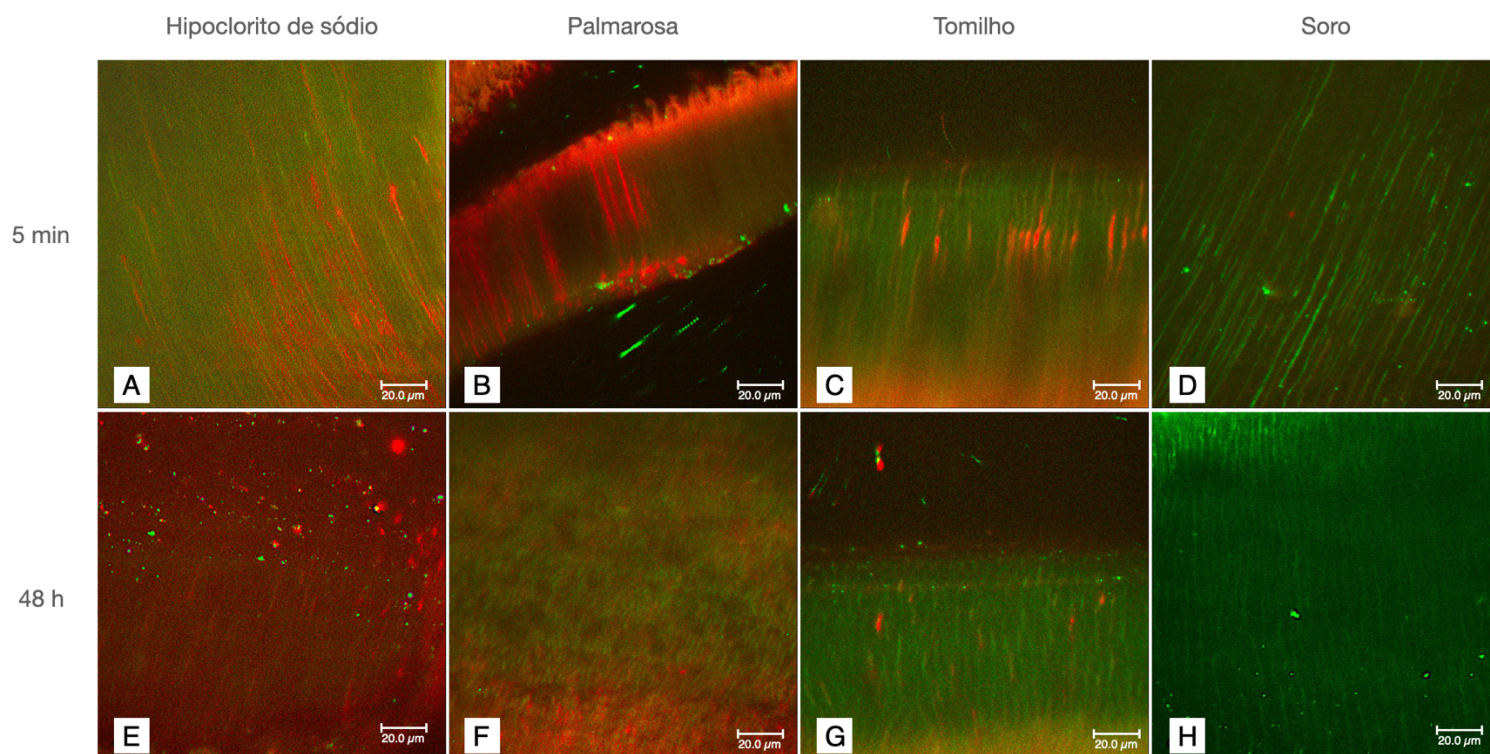


Figura 1 - Análises em microscopia confocal de biofilme tratado com hipoclorito de sódio (A), Palmarosa (B), Tomilho (C) e soro (D) após 5 minutos do tratamento. Análise do biofilme tratado com hipoclorito de sódio (E), Palmarosa (F), Tomilho (G) e soro (H) após 48 horas do tratamento. As células vivas estão indicadas em verde e as células mortas estão indicadas em vermelho. Ampliação original: (A-H) $\times 400$.

Discussão

A cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa ou detecção de ionização de chama, fornece uma descrição detalhada dos compostos dos OEs, expressos em porcentagem da área total, e é uma técnica útil para comparar a composição dos OEs (Gonçalves et al., 2010). Além disso, usando curvas de calibração de terpenos comercialmente disponíveis, pode-se determinar a concentração absoluta de cada composto, o que é útil para determinar a qualidade dos EOs e também se eles foram adulterados por diluição com solventes voláteis. No presente trabalho, a cromatografia gasosa foi eficiente em identificar os terpenos presentes nos EOs utilizados para as emulsões, como forma de explicar os resultados observados.

Uma das características mais importantes que um irrigante endodôntico deve apresentar é a capacidade antimicrobiana. No presente estudo, a atividade antimicrobiana das emulsões de Palmarosa e Tomilho utilizadas em um protocolo de irrigação final, foi avaliada por imagens obtidas a partir da microscopia confocal, sendo o método cada vez

mais utilizado na odontologia para determinar a viabilidade bacteriana (Bukhary & Balto, 2017; Tinoco et al., 2016; Zapata et al., 2008). Uma de suas vantagens é a possibilidade de determinar a viabilidade bacteriana com baixa geração de artefatos. No entanto, este método também apresenta algumas desvantagens, como a impossibilidade de reaproveitamento dos corpos de prova, pois a energia gerada pelo laser torna este processo irreversível pela perda gradativa da fluorescência, dificuldades no preparo do corpo de prova e por não permitir extensos campos de análise, como quando comparado com a microscopia eletrônica de varredura (Ma et al., 2011; Zapata et al., 2008).

Dentre os desafios encontrados no tratamento endodôntico incluem grandes variações no que diz respeito à anatomia dentária, tamanho e forma dos canais, tipo e quantidade de microrganismos presentes e dificuldade em obter amostras bacteriológicas padronizadas de áreas representativas do canal radicular. A replicação *in vitro* da invasão bacteriana nos túbulos dentinários é um modelo de estudo investigado há mais de um século (Miller, 1890). O presente estudo utilizou uma forma de contaminação dos túbulos dentinários com *E. faecalis*, *S. mutans*, *A. israeli*, *L. casei* e *F. nucleatum* utilizando a força de centrifugação para forçar a penetração de bactérias nos túbulos dentinários. Tempos mais curtos para centrifugação não permitem que as bactérias tenham tempo suficiente para penetrar profundamente na dentina. Além disso, se a centrifugação for iniciada com as forças g mais altas, há um rápido acúmulo de bactérias na superfície dentinária, bloqueando as aberturas dos túbulos e limitando assim a penetração de bactérias no interior dos túbulos dentinários.

Enterococcus faecalis foi uma das bactérias utilizadas por ser capaz de sobreviver isoladamente no interior dos canais radiculares, sem o suporte de outras bactérias, e por ser um modelo documentado na literatura (Bago et al., 2013). Além disso, *E. faecalis* é capaz de penetrar profundamente nos túbulos dentinários e formar biofilme, que influencia sua resistência aos agentes antimicrobianos, como soluções irrigadoras e medicação intracanal, sendo frequente em infecções endodônticas persistentes (Shen et al., 2011), assim como os *Enterococos*, de forma arredondada e com um diâmetro de célula relativamente pequeno, o que torna mais fácil forçá-los nos túbulos dentinários. Estudos anteriores mostraram que o biofilme maduro de uma única espécie de *E. faecalis* é estabelecido com 3 semanas (21 dias), mostrando-se maduro e mais resistente a soluções desinfetantes do que o biofilme imaturo (Zeng et al., 2018; Flach et al., 2016; Du et al.,

2014). No biofilme imaturo, as bactérias estão na fase de crescimento ativo e exponencial, e nem o desenvolvimento estrutural do biofilme nem a produção da matriz polimérica extracelular foram finalizados. Portanto, a eficácia antimicrobiana dos irrigantes testados foi realizada em dentina infectada por biofilme de *E. faecalis* de 21 dias, semelhante a outros estudos (Bukhary & Balto, 2017; Rodrigues et al., 2018; Du et al., 2014).

A proporção de bactérias mortas no interior dos túbulos dentinários foi dependente do tempo de exposição e tipo da solução irrigadora utilizada. O excelente desempenho do NaOCl está bem documentado na literatura, e estudos anteriores corroboram com a sua eficácia antibiofilme (Bukhary & Balto, 2017; Ma et al., 2011). O NaOCl apresenta capacidade de dissolver matéria orgânica e destruir a matriz extracelular do biofilme (Zehnder, 2006), o que explica os resultados observados neste trabalho. Embora esta solução tenha a capacidade de se difundir através do biofilme, sua eficácia pode diminuir devido aos efeitos tamponantes da dentina e da matéria orgânica do biofilme, fato este que explica a maior presença de células mortas no período de análise imediato (Haapasalo et al., 2000).

Devido ao grande número de constituintes, os EOs parecem não ter alvos celulares específicos e são fontes potenciais de novos compostos antimicrobianos (Carson et al., 2002). A atividade antimicrobiana deve-se à sua solubilidade na bicamada fosfolipídica das membranas celulares. Como lipófilos típicos, eles atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, rompem a estrutura de suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e os permeabilizam. Em bactérias, a permeabilização das membranas está associada à perda de íons e redução do potencial de membrana, colapso da bomba de prótons e depleção do pool de ATP (Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006). Além disso, os EO podem coagular o citoplasma (Gustafson et al., 1998) e danificar lipídios e proteínas (Burt, 2004). Danos à parede celular e membrana podem levar ao vazamento de macromoléculas e à morte celular (Gustafson et al., 1998; Oussalah et al., 2006).

Uma análise mais aprofundada da composição química dos EOs pode apontar os monoterpenos constituintes que poderiam ser responsáveis pelas propriedades antibacterianas e antibiofilme (Duarte et al., 2007; Marchese et al., 2016). O geraniol, principal monoterpeno identificado no EO de Palmarosa e com forte potencial redutor em relação às bactérias gram-positivas (Gallucci et al., 2009), é de natureza hidrofóbica, e

dificulta a dispersão uniforme da emulsão no interior dos túbulos dentinários e áreas do canal radicular não tocadas pelos instrumentos endodônticos, contendo alto teor de água, o que resulta na atividade antimicrobiana inferior quando comparada com o hipoclorito de sódio (Balta et al., 2017).

O carvacrol é um componente fenólico descrito no quimiotipo do EO de Tomilho. Suspeita-se que as propriedades bacteriostáticas deste EO estejam associadas ao conteúdo de carvacrol, que foi testado anteriormente e demonstrou ter uma atividade antibiótica significativa (Consentino et al., 1999). Além disso, foi observado por Ultee et al. (2002) o sinergismo entre carvacrol e seu precursor p-cimeno. O p-cimeno é um antibacteriano muito fraco e intumescce as membranas das células bacterianas em maior extensão do que o carvacrol. Por esse mecanismo, o p-cimeno provavelmente permite que o carvacrol seja mais facilmente transportado para dentro da célula, de modo que um efeito sinérgico seja alcançado quando os dois forem usados juntos.

Podendo ter efeito antimicrobiano sinérgico com o carvacrol, o timol, monoterpeno fenólico, presente no tomilho, é amplamente estudado por ser considerado o mais eficaz contra o biofilme intracanal de *E. faecalis* (Olasupo et al., 2003; Abbaszadegan et al., 2016; Marino et al., 1999).

Barkat & Bouguerra (2012) estudou as zonas de inibição do timol e do carvacrol contra *S. mutans*, sendo de 7,8 mm e 8,0 mm, respectivamente, na dose de 50 mg/mL cada. Isso implica que o carvacrol tem maior atividade antibacteriana contra *S. mutans* do que o timol. Entretanto, assim como o geraniol, o carvacrol apresenta baixa solubilidade em água (Coimbra et al., 2011).

Os monoterpenos linalol e limonene, presentes nas emulsões de Palmarosa e Tomilho, são capazes de inibir a atividade da lipoxigenase (Cutillas et al., 2018). O limonene tem amplas perspectivas de aplicação antibacteriana devido à sua atividade bactericida de amplo espectro, segurança e baixa toxicidade, podendo inibir significativamente bactérias gram-negativas e gram-positivas, bem como a atividade fúngica (Young et al., 2013; Anis Bem et al., 2011).

O uso de EOs naturais ou compostos extraídos de EOs como os principais agentes antibacterianos, no entanto, ainda enfrenta limitações como: facilidade de degradação ou reatividade química de muitos desses compostos extraídos, solubilidade limitada em água e disponibilidade a curto prazo para bioatividade devido ao seu caráter volátil (Shoji & Nakashima, 2004), informações estas que corroboram com a diminuição de células

bacterianas mortas observadas na análise de 48 horas desta pesquisa e com os resultados inferiores quando comparados ao hipoclorito de sódio.

Conclusão

Podemos concluir que as emulsões de Palmarosa e Tomilho apresentaram atividade antimicrobiana significativa quando utilizadas em um protocolo final de irrigação, porém menos efetivas que o hipoclorito de sódio.

Referências

- Abbaszadegan, A., Sahebi, S., Gholami, A., Delroba, A., Kiani, A., Iraj, A., Abbott, P.V. (2016) Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 7, 93–101.
- Andrade, F.B., Arias, M.P., Maliza, A.G., Duarte, M.A., Graeff, M.S., Amoroso-Silva, P.A., Midena, R.Z., Moraes, I.G. (2015) A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Applied Oral Science*, 23, 591-598.
- Bago, I., Plecko, V., Gabric Panduric, D., Schaperl, Z., Baraba, A., Anic, I. (2013) Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal*, 46, 339–347.
- Balta, I., Brinzan, L., Stratakis, A. (2017) Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnology*, 74, 157–161.
- Barkat, M., Bouguerra, A. (2012) Study of the antifungal activity of essential oil extracted from seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. for its use as food conservative. *African Journal of Food Science*, 6, 239–244.
- Ben-Jabeur, M., Ghabri, E., Myriam, M., Hamada, W. (2015) Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 35-40.

- Bukhary, S., Balto, H. (2017) Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics*, 43, 643–7.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiol*, 94, 223-53.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002) 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1914-1920.
- Cieplik, F., Jakubovics, N.S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2019) Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria – is there cause for concern? *Frontiers in Microbiology*, 10, 587.
- Coimbra, M., Isacchi, B., Bloois, L., Torano, J.S., Ket, A., Wu, X., Broere, F., Metselaar, J.M., Rijcken, C.J.F., Storm, G., Bilia, R., Schiffelers, R.M. (2011) Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 416, 433–442.
- Consentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Arzedi, E., Palmas, F. (1999) *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian Thymus essential oils. *Letters of Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela, J. (2018) Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC-MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. *Journal of Food Drug Analysis*, 26, 529-544.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G. (2006) Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2745-2749.
- Du, T., Wang, Z., Shen, Y., Ma, J., Cao, Y., Haapasalo, M. (2014) Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of Endodontics*, 40, 509–514.
- Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., & Sartoratto, A. (2007) Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 197–201.

- Duncan, R., Izzo, L. (2005) Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 2215-2237.
- Estrela, C., Sousa-Neto, M.D., Alves, D.R., Alencar, A.H., Santos, T.O., Pecora, J.D. (2012) A preliminar study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. *Brazilian Dental Journal*, 23, 645-653.
- Flach, N., Bottcher, D.E., Parolo, C.C., Firmino, L.B., Malt, M., Lammers, M.L., Grecca, F.S. (2016) Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An *in vitro* study. *Scanning*, 38, 57– 62.
- Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J. (2009) Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24, 348–354
- Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., Salgueiro, L. (2010) Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp *sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32, 70-75.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R. (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 194-198.
- Haapasalo, H., Sirén, E., Waltimo, T., Ørstavik, D., Haapasalo, M.P. (2000) Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *International Endodontic Journal*, 33, 126–131.
- Heard, F., Walton, R.E. (1997) Scanning electron microscope study comparing four root canal preparation techniques in small curved canals. *International Endodontic Journal*, 30, 323-331.
- Horiba, N., Maekawa, Y., Matsumoto, T., Nakamura, H. (1990) A study of the distribution of andotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *Journal of Endodontics*, 16, 331-334.
- Hsouna, A.B., Trigui, M., Mansour, R.B., Jarraya, R.M., Damak, M., Jaoua, S. (2011) Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 66–72.
- Jungermann, G.B., Burns, K., Nandakumar, R., Tolba, M., Veneziam, R., & Fouad, A.F. (2011) Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *Journal of the British Endodontic Society*, 37, 1337–1344.

- Kakaraparthi, P.S., Srinivas, K.V.N.S., Kumar, J.K., Kumar, A.N., Rajput, D.K., Anubala, S. (2015) Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 69, 348–354.
- Kalagatur, N.K., Nirmal Ghosh, O.S., Sundararaj, N., Mudili, V. (2018) Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. *Frontiers of Pharmacology*, 9, 610.
- Kim, Y.W., Kim, M.J., Chung, B.Y., Bang du, Y., Lim, S.K., Choi, S.M., Lim, D.S., Cho, M.C., Yoon, K., Kim, H.S., Kim, K.B., Kim, Y.S., Kwack, S.J., Lee, B.M. (2013) Safety evaluation and risk assessment of d-limonene. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B*, 16, 17–38.
- Kitagawa, H., Izutani, N., Kitagawa, R., Maezono, H., Yamaguchi, M., & Imazato, S. (2016) Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry*, 47, 18–22.
- Ma, J., Wang, Z., Shen, Y., Haapasalo, M. (2011) A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Endodontics*, 37, 1380–1385.
- Marchese, A., Orhan, I.E., Daglia, M., Barbieri, R., Lorenzo, A.D., Nabavi, S.F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S.M. (2016) Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry* 210, 402–444.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (1999) Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of food protection*, 62, 1017-1023.
- Miller, W.D. (1890) The micro-organisms of the human mouth. *Philadelphia: SS White Manufacturing Co.*
- Olasupo, N., Fitzgerald, D., Gasson, M., Narbad, A. (2003) Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* sero var. *typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 448-451.
- Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M. (2006) Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69, 1046-1055.

- Paiva, J.G., Gutz, I., Sampaio, J.M.P., Simões, W. (1989) Determinação do teor de cloro livre nas soluções de hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Odontologia*, 46, 10-16.
- Pereira, I., Severino, P., Santos, A.C., Silva, A.M., Souto, E.B. (2018) Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 171, 566-578.
- Poggio, C., Colombo, M., Scribante, A., Sforza, D., Bianchi, S. (2012) *In vitro* antibacterial activity of diferente endodontic irrigants. Dental Traumatology: oficial publication of International. *Association for Dental Traumatology*, 28, 205-209.
- Rodig, T., Sedghi, M., Konietzschke, F., Lange, K., Ziebolz, D., Hulsmann, M. (2010) Efficacy of syringe irrigations, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. *International Endodontic Journal*, 43, 581-589.
- Rodrigues, C.T., de Andrade, F.B., de Vasconcelos, L.R.S.M., Midena, R.Z., Pereira, T.C., Kuga, M.C., Duarte, M.A.H., Bernardineli, N. (2018) Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *International Endodontic Journal*, 51, 901-911.
- Shen, Y., Stojicic, S., Haapasalo, M. (2011) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *Journal of Endodontics*, 37, 657-661.
- Shin, S.J., Kim, H.K., Jung, I.Y., Lee, C.Y., Lee, S.J., Kim, E. (2010) Comparison of the cleaning efficacy of a new apical negative pressure irrigant system with convencional irrigation needles in the root canals. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 109, 479-484.
- Shoji, Y., Nakashima, H. (2004) Nutraceutics and delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 12, 385-391.
- Siqueira, J.F. Jr., Rôças, I.N. (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *Journal of Endodontics*, 34, 1291-1301.
- Siqueira, J.F., Jr., Batista, M.M., Fraga, R.C., de Uzeda, M. (1998) Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *Journal of Endodontics*, 26, 414-416.
- Thosar, N.R., Chandak, M., Bhat, M., Basak, S. (2018) Evaluation of Antimicrobial Activity of Two Endodontic Sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide

- Eugenol against Root Canal Microorganisms- An *in vitro* Study. *Internatinal Journal of Clinical Pediatric Dentstry*, 11, 79-82.
- Tinoco, J.M., Buttaro, B., Zhang, H., Liss, N., Sassone, L., Stevens, R. (2016) Effect of a genetically engineered bacteriophage on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 71, 80–86.
- Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A. (2006) Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122, 101-113.
- Ultee, A., Bennink, M.H., Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogens *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.
- Vivan, R.R., Duque, J.A., Alcalde, M.P., Só, M.V., Bramante, C.M., Duarte, M.A. (2016) Evaluation of Different Passive Ultrasonic Irrigation Protocols on the Removal of Dentinal Debris from Artificial Grooves. *Brazilian Dental Journal*, 27, 568–572.
- Wang, S., Wang, H., Ren, B., Li, H., Weir, M.D., Zhou, X., et al. (2017) Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and periodontal bacterial species? *Dental Materials*, 33, 1127–1138.
- Weller, R.N., Brady, J.M., Bernier, W.E. (1980) Efficacy of ultrasonic cleaning. *Journal of Endodontic*, 6, 740-743.
- Zancan, R.F., Canali, L.C.F., Tartari, T., Andrade, F.B., Vivan, R.R., Duarte, M.A.H. (2018) Do different strains of *E. Faecalis* have the same behavior towards intracanal medications in vitro research? *Brazilian Oral Research*, 32:e46.
- Zapata, R.O., Bramante, C.M., de Moraes, I.G., Bernardineli, N., Gasparoto, T.H., Graeff, M.S., Campanelli, A.P., Garcia, R.B. (2008) Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *Journal of Endodontics*, 34, 1198–1201.
- Zehnder, M. (2006) Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, 32, 389-398.
- Zeng, C., Willison, J., Meghil, M.M., Bergeron, B.E., Cutler, C.W., Tay, F.R., Niu, L., Ma, J. (2018) Antibacterial efficacy of an endodontic sonic-powered irrigation system: an *in vitro* study. *Journal of Dentistry*, 75, 105–112.

ANEXO A

Referências da introdução geral

- Ben-Jabeur M, Ghabri E, Myriam M, Hamada W. (2015) Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. *Plant Physiology and Biochemistry* **94**, 35-40.
- Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, & Al-Ahmad A (2019) Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria – is there cause for concern? *Frontiers in Microbiology* **10**, 587.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F (1999) *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 130–135.
- de Oliveira MA, da C Vegian MR, Brighenti FL, Salvador MJ, Koga-Ito CY (2021) Antibiofilm effects of *Thymus vulgaris* and *Hyptis spicigera* essential oils on cariogenic bacteria. *Future Microbiology* **16**, 241-55.
- de Oliveira MA, da C Vegian MR, Brighenti FL, Salvador MJ, Koga-Ito CY (2021) Antibiofilm effects of *Thymus vulgaris* and *Hyptis spicigera* essential oils on cariogenic bacteria. *Future Microbiology* **16**, 241-55.
- Duncan R, Izzo L (2005) Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 2215-37.
- Duque JA, Duarte MA, Canali LC, et al (2017) Comparative Effectiveness of New Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars. *Journal of Endodontic* **43**, 326–31.
- Estrela C, Sousa-Neto MD, Alves DR, Alencar AH, Santos TO, Pecora JD (2012) A preliminar study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. *Brazilian Dental Journal* **23**, 645-53.
- Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, Carvalho MD, Cunha JM, Grespan R, Bersani-Amado CA, Cuman RK (2012) Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, 1–10.
- Faras F, Abo-Alhassan F, Sadeq A, Burezq H (2016) Complication of improper management of sodium hypochlorite accident during root canal treatment. *Journal of International Society of Preventive Community Dentistry* **6**, 493-496.

- Gemeda N, Tadele A, Lemma H, et al (2018) Development, Characterization, and Evaluation of Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Topical Formulations from *Cymbopogon martini* (Roxb.) W. Watson Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2018**, 9812093.
- Gomes BPFA, Sato E, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2003) Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. International Endodontic Journal **36**, 604-9.
- Gupta P, Dhawan SS, Lal RK (2015) Adaptability and stability based differentiation and selection in aromatic grasses (*Cymbopogon* species) germplasm. Industrial Crops and Products **78**, 1–8.
- Heard F, Walton RE (1997) Scanning electron microscope study comparing four root canal preparation techniques in small curved canals. International Endodontic Journal, **30**, 323-31.
- Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H (1990) A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. Journal of Endodontics **16**, 331-4.
- Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia R, & Fouad AF (2011) Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. Journal of the British Endodontic Society **37**, 1337–44.
- Kakaraparthi PS, Srinivas KVNS, Kumar JK, Kumar AN, Rajput DK, Anubala S (2015) Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. Industrial Crops and Products **69**, 348–54.
- Kalagatur NK, Nirmal Ghosh OS, Sundararaj N, Mudili V (2018) Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. Frontiers of Pharmacology **9**, 610.
- Kitagawa H, Izutani N, Kitagawa R, Maezono H, Yamaguchi M, & Imazato S (2016) Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. Journal of Dentistry **47**, 18–22.
- Manconi M, Petretto G, D'hallewin G, Escribano E, Milia E, Pinna R, Palmieri A, Firoznejhad M, Peris JE, Usach I, Fadda AM, Caddeo C, Manca ML (2018) Thymus essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces **171**, 115-22.

- Murbach Teles Andrade BF, Conti BJ, Santiago KB, Fernandes Júnior A, Sforcin JM (2014) *Cymbopogon martini* essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/ anti-inflammatory effects in human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **66**, 1491–6.
- Nair PN (2006) On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Endodontic Journal* **39**, 249-81.
- Paiva JG, Gutz I, Sampaio JMP, Simões W (1989) Determinação do teor de cloro livre nas soluções de hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Odontologia*. **46**, 10-6.
- Pereira I, Severino P, Santos AC, Silva AM, Souto EB (2018) Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* **171**, 566-78.
- Poggio C, Colombo M, Scribante A, Sforza D, Bianchi S (2012) *In vitro* antibacterial activity of diferente endodontic irrigants. *Dental Traumatology: official publication of International Association for Dental Traumatology* **28**, 205-9.
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S (2006) *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **6**, 39.
- Ríos JL, Recio MC, Escandell JM, Andújar I (2009) Inhibition of transcription factors by plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design* **15**, 1212–37.
- Rodig T, Sedghi M, Konietschke F, Lange K, Ziebolz D, Hulsmann M (2010) Efficacy of syringe irrigations, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. *International Endodontic Journal* **43**, 581-9.
- Sakkas H, Papadopoulou C (2017) Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**, 429-38.
- Shin SJ, Kim, HK, Jung IY, Lee CY, Lee SJ, Kim E (2010) Comparison of the cleaning efficacy of a new apical negative pressure irrigant system with convencional irrigation needles in the root canals. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **109**, 479-84.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *Journal of Endodontics* **34**, 1291-301.
- Siqueira JF, Jr., Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M (1998) Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *Journal of Endodontics* **26**, 414-6.

Tardugno R, Serio A, Purgatorio C, Savini V, Paparella A, Benvenuti S (2022) *Thymus vulgaris* L. essential oils from Emilia Romagna Apennines (Italy): phytochemical composition and antimicrobial activity on food-borne pathogens. *Natural Product Research* **36**, 837-42.

Thosar NR, Chandak M, Bhat M, Basak S (2018) Evaluation of Antimicrobial Activity of Two Endodontic Sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide Eugenol against Root Canal Microorganisms- An *in vitro* Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry* **11**, 79-82.

Vivan RR, Duque JA, Alcalde MP, Só MV, Bramante CM, Duarte MA (2016) Evaluation of Different Passive Ultrasonic Irrigation Protocols on the Removal of Dentinal Debris from Artificial Grooves. *Brazilian Dental Journal* **27**, 568–72.

Wang S, Wang H, Ren B, Li H, Weir MD, Zhou X, et al. (2017) Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and peri-odontal bacterial species? *Dental Materials* **33**, 1127–38.

Weller RN, Brady JM, Bernier WE (1980) Efficacy of ultrasonic cleaning. *Journal of Endodontics* **6**, 740-3.

Zehnder M (2006) Root canal irrigants. *Journal of Endodontics* **32**, 389-98.

ANEXO B



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação in vivo e in vitro das nanoemulsões de tomilho e palma rosa como agentes irrigantes finais para o tratamento endodôntico**", Processo FOA nº 0209-2022, sob responsabilidade de Eloi Dezan Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Abril de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Dezembro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Janeiro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**In vivo and in vitro evaluation of thyme and palm rose nanoemulsions as final irrigating agents for endodontic treatment**", Protocol FOA nº 0209-2022, under the supervision of Eloi Dezan Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 25, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 01, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 01, 2023.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO C

Author Guidelines International Endodontic Journal

1. GENERAL

The International Endodontic Journal publishes original scientific articles, systematic and narrative reviews, clinical articles and case reports in the field of Endodontology; the branch of dental sciences dealing with health, injuries to and diseases of the pulp and periradicular region, and their relationship with systemic health and well-being. Original scientific articles and reviews are published in the areas of biomedical science, applied materials science, bioengineering, epidemiology and social science relevant to endodontic disease and its management, and the restoration of endodontically treated teeth. In addition, letters to the editor, book reviews, summaries and abstracts of scientific meetings, news items and significant obituaries and retirements are accepted nsubject to the approval of the Editor-in-Chief.

1.1 Preprints Policy

The International Endodontic Journal will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

1.2. Data Sharing

The International Endodontic Journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper. All accepted manuscripts may elect to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Sample statements are available here. If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

1.3 Open Access

The International Endodontic Journal is a subscription journal that offers an open access option. You'll have the option to choose to make your article open access after acceptance, which will be subject to an APC. You can read more about APCs and

whether you may be eligible for waivers or discounts, through your institution, funder, or a country waiver.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the International Endodontic Journal. Authors are encouraged to visit Wiley Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

The International Endodontic Journal adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1 Authorship

The policy of the journal is that only ONE corresponding author is accepted.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

The International Endodontic Journal adheres to the definition of authorship established by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on:

1. substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data

2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and
3. final approval of the version to be published.

Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

2.2 Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above-mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board must also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been adopted.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain and discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study. The authors **MUST** upload a copy of the ethical approval letter when submitting their manuscript and a separate English translation. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

The International Endodontic Journal asks that authors submitting manuscripts reporting a clinical trial register the trial a priori in any of the following public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>,

<http://isrctn.org/>. Other primary registries if named in the WHO network will also be considered acceptable. The clinical trial registration number and name of the trial register should be included in the Acknowledgements at the submission stage.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Acknowledgements

Authors should specify contributors to the article other than the authors accredited.

Thus, the Acknowledgements should include the details (names and affiliations) of individuals who helped in conducting the research or statistical analysis or, translated, or edited the manuscript.

2.6 Conflict of Interest

Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. The International Endodontic Journal requires that both the corresponding author and co-authors must disclose any potential sources of conflict of interest. The International Endodontic Journal has adopted the recommendations provided by ICMJE (<http://www.icmje.org/>) related to conflicts of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company.

If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, they are advised contact the Editor-in-Chief.

It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms individually (do not combine the forms into one file) together while submitting the manuscript at <https://mc.manuscriptcentral.com/iej>.

The form can be accessed using the following link: [Conflict of Interest Disclosure Form](#)

2.7 Source of Funding

All sources of funding for a study must be disclosed. Authors must provide details about direct funding (e.g. consulting payments, fees) or ownership (shareholdings and patents) or indirect funding (e.g. donations of equipment, instruments) that was received. Authors must report the names of the sponsors or funding agency with funding/grant number. Funds and resources provided by academic institutions must also be disclosed to ensure transparency, e.g. academic staff, support staff, clinical facilities, purchase of consumables and equipment etc.

2.8 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.9 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts must be submitted electronically via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/iej>.

The use of the online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from iejeditor@cardiff.ac.uk.

3.1 ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the International Endodontic Journal encourages authors to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. Please see Wiley's resources on ORCID [here](#)

3.2. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission. However, only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the abstract, main text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures or Title page. The Title page should be uploaded as a separate file. On a separate page after the references, please reference figures as 'Figure 1', 'Figure 2' etc. to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded and provide a brief legend that described the image but does not repeat information that should be in the main body of the text. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.3. Blinded Review

Manuscript that do not conform to the general aims and scope of the journal will be returned immediately without review. All other manuscripts will be reviewed by experts in the field, first by an associate editor and if appropriate by (generally) two or more referees. The International Endodontic Journal aims to forward the comments of the referees and to inform the corresponding author of the result of the review process. Manuscripts will be considered for fast-track publication under special circumstances after consultation with the Editor-in-Chief.

The International Endodontic Journal uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers.

To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files.

Please upload:

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
- Figure files under the file designation 'figures'
- The title page and Acknowledgements where applicable, should be uploaded

under the file designation 'title page'

All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the HTML and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.4. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.5. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Scientific Articles (includes Clinical Research (randomized control trials, cohort studies, case control studies, cross sectional studies, case series), Basic Research – Biological, Basic Research — Technical, and Education): These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original Scientific Articles must conform to the highest international standards in the field.

Review Articles (systematic and narrative):

These are accepted for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should generally include a clearly defined search strategy and take a broad view of the field rather than merely summarizing the literature. Extensive or unbalanced citation of the authors' own publications is not acceptable.

Clinical Techniques: These can describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognised

clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports: These can illustrate unusual and clinically relevant and new observations, but they must be of sufficiently high quality to be considered worthy of publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered. Illustrative material must be of the highest quality and healing outcomes, if appropriate, should be demonstrated after an extended period – normally four years.

Supporting Information:

The International Endodontic Journal encourages submission of adjuncts to printed papers via the supporting information website (see submission of supporting information below). Authors wishing to describe novel procedures or illustrate cases more fully with figures and/or video may be encouraged to utilise this facility.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. It is preferred that manuscript is professionally edited.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their research findings or clinical reports so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable. Abbreviations should also be kept to a minimum, particularly those that are not standard. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Article Preparation Support: Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for *Preparing Your Article* for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Abbreviations: The International Endodontic Journal adheres to the conventions

outlined in *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated, they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

5.2. Reporting guidelines 5.2.1. Case reports/case series

Case reports should be written to comply with the Preferred Reporting Items for Case reports in Endodontics (PRICE) 2020 guidelines (Nagendrababu et al. 2020, doi:10.1111/iej.13285).

When submitting manuscripts that have been written using the PRICE 2020 guidelines, authors should include the following statement in the beginning of “Report” section: “This case report has been written according to Preferred Reporting Items for Case reports in Endodontics (PRICE) 2020 guidelines (Nagendrababu et al. 2020, doi: 10.1111/iej.13285).

A PRICE checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the submission material. The PRICE 2020 checklist and flowchart can be downloaded

from: <http://pride-endodonticguidelines.org/price/>.

It is recommended that authors consult the following papers when writing case reports, which explains the rationale for the PRICE 2020 guidelines and their importance:

Nagendrababu V, Chong BS, McCabe P, Shah PK, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Setzer FC, Sunde PT, Dummer PMH (2020) PRICE 2020 guidelines for reporting case reports in Endodontics: a consensus-based development. *International Endodontic Journal* 53, 619-26. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32090342>)

Nagendrababu V, Chong BS, McCabe P, Shah PK, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Dummer PMH (2020) PRICE 2020 guidelines for reporting case reports in Endodontics: Explanation and elaboration. *International Endodontic Journal* 53, 922-

47. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13300>)

5.2.2. Randomised clinical trials

Randomised clinical trials should be reported to comply with the Preferred Reporting Items for RAndomized Trials in Endodontics (PRIRATE) 2020 guidelines (Nagendrababu et al. 2020, doi: 10.1111/iej.13294).

When submitting manuscripts that have been written using the PRIRATE 2020 guidelines, authors should include the following statement in the beginning of “Materials and Methods” section: “This randomised clinical trial has been written according to Preferred Reporting Items for RAndomized Trials in Endodontics (PRIRATE) 2020 guidelines (Nagendrababu et al. 2020, doi: 10.1111/iej.13294).

A PRIRATE 2020 checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the

submission material. The PRIRATE 2020 checklist and flowchart can be downloaded from: <http://pride-endodonticguidelines.org/prirate/>

It is recommended that authors consult the following papers when writing manuscripts, which explains the rationale for the PRIRATE 2020 guidelines and their importance:

Nagendrababu V, Duncan HF, Bjørndal L, Kvist T, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Pigg M, Rechenberg DK, Vaeth M, Dummer PMH (2020) PRIRATE 2020 guidelines for reporting randomized trials in Endodontics: a consensus-based

development. International Endodontic Journal 53, 764-73.
(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13294>)

Nagendrababu V, Duncan HF, Bjørndal L, Kvist T, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Dummer PMH (2020) PRIRATE 2020 guidelines for reporting randomized trials in Endodontics: Explanation and elaboration. International Endodontic Journal 53, 774- 03.
(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13304>)

5.2.3. Epidemiological observational trials

Observational studies should be written using the STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology' (STROBE) guidelines. Compliance with this should be detailed in the “Materials and Methods” section. (www.strobe-statement.org). A STROBE checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the submission material.

It is recommended that authors consult the following papers when writing manuscripts, which explains the rationale for the STROBE guidelines and their importance:

Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, Strobe Initiative (2014) The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. International Journal of Surgery 12, 1495-9.

Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M, STROBE Initiative. (2014) Strengthening

the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *International Journal of Surgery* 12, 1500–24

5.2.4. Diagnostic accuracy studies

Diagnostic accuracy studies should be written using the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD) 2015 guidelines. Compliance with this should be detailed in the “Materials and Methods” section. A STRAD checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the submission material. The STRAD checklist and flowchart can be downloaded from: <https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard/>

It is recommended that authors consult the following papers when writing manuscripts, which explain the rationale for the STRAD guidelines and their importance:

Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, Bruns DE, Gatsonis CA, Hooft L, Irwig L, Levine D, Reitsma JB, de Vet HCW, Bossuyt PMM. (2016) STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open* 6, e012799

<http://bmjopen.bmj.com/content/6/11/e012799.abstract>

5.2.5. Animal studies

Animal studies should be written using the Preferred Reporting Items for Animal Studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al. 2021, doi: 10.1111/iej.13477).

When submitting manuscripts that have been written using the PRIASE 2021 guidelines, authors should include the following statement in the beginning of “Materials and Methods” section: “The manuscript of this animal study has been written according to Preferred Reporting Items for Animal studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al. 2021, doi: 10.1111/iej.13477).

A PRIASE 2021 checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the submission material. The PRIASE 2021 checklist and flowchart can be downloaded from: <http://pride-endodonticguidelines.org/priase/>

It is recommended that authors consult the following papers when writing manuscripts, which explain the rationale for the PRIASE 2021 guidelines and their importance:

Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JA, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Camilleri J, RM S, Dummer PMH (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *International Endodontic Journal* 54, 848-57. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.13477>)

Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JA, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Jakovljevic A, Dummer PMH (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: Explanation and Elaboration. *International Endodontic Journal* 54, 858-86. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.13481>)

5.2.6. Laboratory studies

Laboratory studies should be reported using the Preferred Reporting Items for Laboratory studies in Endodontology (PRILE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al. 2021, doi: 10.1111/iej.13542).

When submitting manuscripts that have been written using the PRILE 2021 guidelines, authors should include the following statement in the beginning of “Materials and Methods” section: “The manuscript of this laboratory study has been written according to Preferred Reporting Items for Laboratory studies in Endodontology (PRILE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al. 2021, doi: 10.1111/iej.13542).

A PRILE checklist (for editors/referees) and flowchart (as a Figure to be included in the manuscript for readers) should also be completed and included in the submission material. The PRILE 2021 checklist and flowchart can be downloaded

from: <http://pride-endodonticguidelines.org/prile/>

It is recommended that authors consult the following papers when writing manuscripts, which explain the rationale for the PRILE 2021 guidelines and their importance:

Nagendrababu V, Murray PE, Ordinola-Zapata R, OA Peters, IN Rôças, JF Siqueira Jr, E Priya, J Jayaraman, SJ Pulikkotil, J Camilleri, C Boutsoukis, G Rossi-Fedele, PMH Dummer (2021) PRILE 2021 guidelines for reporting laboratory studies in Endodontics: a consensus-based development. *International Endodontic Journal* May 3. doi: 10.1111/iej.13542. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13542>)

Nagendrababu V, Murray PE, Ordinola-Zapata R, OA Peters, IN Rôças, JF Siqueira Jr, E Priya, J Jayaraman, SJ Pulikkotil, N Suresh, PMH Dummer (2021) PRILE 2021 guidelines for reporting laboratory studies in Endodontics: Explanation and

elaboration. *International Endodontic*

Journal (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13565>) 5.2.7 Systematic reviews

The abstract and main body of the systematic review should be reported using the PRISMA for Abstract and PRISMA guidelines respectively (<http://www.prisma-statement.org/>). Authors submitting a systematic review must register the protocol in one of the readily-accessible sources/databases at the time of project inception and not retrospectively (e.g. PROSPERO database, OSF registries). The protocol registration

number, name of the database or journal reference should be provided at the submission stage in the “Registration” section in the abstract and ‘Methods’ section in the main body of the text.

A PRISMA checklist and flow diagram as a Figure (to be included in the manuscript for readers) should also be included in the submission material. Source of funding (grant number, if available) should be added in the ‘Acknowledgements’ section.

It is recommended that authors consult the following papers, which help in the production of high quality reviews:

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLOS Medicine* 6, e1000097.

Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D (2009) The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Journal of Clinical Epidemiology* 62, e1- 34.

Nagendrababu V, Duncan HF, Tsesis I, Sathorn C, Pulikkotil SJ, Dharmarajan L, Dummer PMH (2019) PRISMA for abstracts: best practice for reporting abstracts of systematic reviews in Endodontology. *International Endodontic Journal* 52, 1096-

1107. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.13118>)

Nagendrababu V, Dilokthornsakul P, Jinatongthai P, Veettil SK, Pulikkotil SJ, Duncan HF, Dummer PMH (2020) Glossary for systematic reviews and meta-analyses. *International Endodontic Journal* 53, 232-

249. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/iej.13217>)

5.3. Structure

All manuscripts submitted to *International Endodontic Journal* should include Title Page, Abstract, Main Text, References and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

All manuscripts submitted to the *International Endodontic Journal* should include Title Page (separate file), Abstract, Main Text, References, Acknowledgements, Funding, Conflict of Interest, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

Title Page: The title page should bear: (i) Title, which should be concise as well as descriptive; (ii) Initial(s) and last (family) name of each author; (iii) Name and address of department, hospital or institution to which work should be attributed (excluding street names and postal codes); (iv) Running title (no more than 30 letters and spaces); (v) No more than six keywords (in alphabetical order); (vi) Name, full postal address, telephone, fax number and e-mail address of the author responsible for correspondence.

Abstract for Original Scientific Articles (includes Clinical Research (randomized control trials, cohort studies, case control studies, cross sectional studies, case series), Basic Research – Biological, Basic Research - Technical and Education) should be no more than 350 words giving details of what was done using the following structure:

- Aim: Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.
- Methodology: Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and statistical tests.
- Results: Give the main results of the study, including the outcome of any statistical analysis.
- Conclusions: State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.
- Funding: Provide the primary source of funding with grant number for the study (if no funding: say 'none').
- Conflict of interest: Specify potential conflicts of interest for all authors. If no conflict exists, the authors must explicitly state so.

Abstract for Systematic Review Articles should be no more than 350 words using the following structure where applicable:

- Title: Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.
- Background: Provide a brief introduction of the subject and why it is important.

- Objectives: The research question including components such as participants, interventions, comparators, and outcomes. Use PICO format.
- Methods: Briefly describe i) the inclusion criteria, ii) provide databases searched and dates, iii) mention the method used to assess study quality (risk of bias) iv) meta-analysis methodology (if appropriate).
- Results: i) Number and type of included studies and participants ii) results for main outcomes (benefits and harms). If a meta-analysis was undertaken, include summary measures and confidence intervals. iii) direction of the effect in terms that are meaningful to clinicians and patients.
- Discussion: i) Strengths and ii) limitations of evidence.
- Conclusions: General interpretation of the results and important implications. • Funding: Primary source of funding for the review (if no funding: say 'none').
- Registration: Registration number and name.

Abstract for Review Articles (narrative)

The Abstract should be unstructured and no more than 350 words.

Abstract for Clinical Techniques and Case Reports should be no more than 350 words using the following structure:

- Aim: Give a clear statement of the main aim of the report and the clinical problem which is addressed.
- Summary: Describe briefly the clinical technique(s) or the case report(s).
- Key learning points: Provide up to 5 short, bullet-pointed statements to highlight the key messages of the report. All points must be fully justified by material presented in the report.

Main Text of Original Scientific Article should include Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion:

- **Introduction:** should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and gaps in knowledge. Exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation, or hypothesis to be tested.
- **Material and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced.

Experimental Subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental

procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (product: company, town/city, state, country) included.

- **Results:** should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Data should not be duplicated in Tables and Figures.

- Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The Discussion section should progress with a critical review of the methodology before discussing the results in light of previous work in the field. The Discussion should include the strengths and limitations of the work and should end with a brief summary and a comment on the potential clinical relevance of the findings, if any. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.
- Conclusion: should contain a summary of the findings.

Main Text of Systematic Review Articles should be divided into Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions, Funding and Conflict of Interest:

- Introduction: Should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review.
- Method: Divide into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding (e.g. details of protocol registration, literature search process, inclusion/exclusion criteria, data extraction, quality assessment, outcome(s) of interest, data synthesis and statistical analysis, quality of evidence).
- Results: Present in structured fashion (e.g. results of the search process, characteristics of the included studies, results of primary meta-analysis, additional analysis, publication bias, quality of evidence).
- Discussion: Should summarize the results, highlighting completeness and applicability of evidence, quality of evidence, agreements and disagreements with other studies or reviews, strength and limitations, implications for practice and research.
- Conclusion(s): Section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.
- Funding: Provide the primary source of funding with grant number for the study (if no funding: say 'none').

- Conflict of Interest: Need to specify potential conflicts of interest for all the authors. If no conflict exists, the authors must explicitly state so.

Main Text of Review Articles should be divided into Introduction, Review and Conclusions. The Introduction section should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review. The Review section should be divided into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding. Search strategies must be described and the use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. The use of tabulated and illustrative material is encouraged. The Conclusion section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.

Main Text of Clinical Techniques and Case Reports should be divided into Introduction, Report, Discussion and Conclusion. They should be well illustrated with clinical images, radiographs, diagrams and, where appropriate, supporting tables and graphs. However, all illustrations must be of the highest quality.

Acknowledgments: Acknowledgments should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. See also above under Ethical Guidelines.

Funding: The International Endodontic Journal requires that all sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged. Grant or contribution numbers may be acknowledged, and principal grant holders should be listed.

Conflict of Interest: Any potential conflicts of interest must be noted.

5.4. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. The EndNote reference style can be obtained upon request

to the editorial office (iejeditor@cardiff.ac.uk). Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

In the text: single or double authors should be acknowledged together with the year of publication, e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990). If more than two authors the first author followed by et al. is sufficient, e.g. (Tobias et al. 1991). If more than 1 paper is cited the references should be in year order and separated by "," e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990, Tobias et al. 1991).

Reference list: All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order and should be in the following form.

(i) Names and initials of up to six authors. When there are seven or more, list the first

three

(ii) Year

(iii) Full

(iv) Title (v) Volume

and add et

al.

title

of of

paper journal

(bold)

followed by in

followed

a

full (in

of

number

publication

in

full by

parentheses stop (.) italics) comma (,)

a

(vi) First and last pages

Examples of correct forms of reference follow:

Standard journal article

Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M (1991) Class II antigen-expressing cells in experimentally induced pulpitis. *International Endodontic Journal* 24, 8-14.

Corporate author

British Endodontic Society (1983) Guidelines for root canal treatment. *International Endodontic Journal* 16, 192-5.

Journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M (1979) Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood* 54 (Suppl. 1), 26a.

Books and other monographs

Personal author(s)

Gutmann J, Harrison JW (1991) *Surgical Endodontics*, 1st edn Boston, MA, USA: Blackwell Scientific Publications.

Chapter in a book

Wesselink P (1990) Conventional root-canal therapy III: root filling. In: Harty FJ, ed. *Endodontics in Clinical Practice*, 3rd edn; pp. 186-223. London, UK: Butterworth.

Published proceedings paper

DuPont B (1974) Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Rematology*; pp. 44- 46. Houston, TX, USA: International Society for Experimental Hematology.

Agency publication

Ranofsky AL (1978) *Surgical Operations in Short-Stay Hospitals: United States-1975*. DHEW publication no. (PHS) 78-1785 (Vital and Health Statistics; Series 13; no. 34.) Hyattsville, MD, USA: National Centre for Health Statistics.⁸

Dissertation or thesis

Saunders EM (1988) *In vitro and in vivo investigations into root-canal obturation using thermally softened gutta-percha techniques (PhD Thesis)*. Dundee, UK: University of Dundee.

URLs

Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Smith A (1999) *Select committee report into social care in the community [WWW document]*. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html> [accessed on 7 November 2003]

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction, symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Reduction to the

scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be

wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures

should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by a thin space (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Figure legends: Figure legends should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

Permissions: If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for

printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/echecklist.asp>

5.6. Guidelines for reporting of DNA microarray data

The International Endodontic Journal gives authors notice that, with effect from 1st January 2011, submission to the International Endodontic Journal requires the reporting of microarray data to conform to the MIAME guidelines. After this date, submissions will be assessed according to MIAME standards. The complete current guidelines are available at http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_2.0.html. Also, manuscripts will be published only after the complete data has been submitted into the public repositories, such as GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or ArrayExpress (http://www.ebi.ac.uk/microarray/submissions_overview.html), in MIAME compliant format, with the data accession number (the identification number of the data

set in the database) quoted in the manuscript. Both databases are committed to keeping the data private until the associated manuscript is published, if requested.

Prospective authors are also encouraged to search for previously published microarray data with relevance to their own data, and to report whether such data exists. Furthermore, they are encouraged to use the previously published data for qualitative and/or quantitative comparison with their own data, whenever suitable. To fully acknowledge the original work, an appropriate reference should be given not only to the database in question, but also to the original article in which the data was first published. This open approach will increase the availability and use of these large-scale data sets and improve the reporting and interpretation of the findings, and in increasing the comprehensive understanding of the physiology and pathology of endodontically related tissues and diseases, result eventually in better patient care.

5.7. Supporting Information

Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only. Authors need to work closely with the editors in developing or using such new publication formats.

Supporting information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted. It should be clearly stated at the time of submission that the supporting information is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the supporting information is such that it cannot be accommodated on the journal's website, the author agrees to make the supporting

information available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the supporting information is located changes. The content of the supporting information must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Information' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The supporting information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

Preparation of Supporting Information: Although provision of content through the web in any format is straightforward, supporting information is best provided either in web-ready form or in a form that can be conveniently converted into one of the standard web publishing formats:

- Simple word-processing files (.doc or .rtf) for text.
- PDF for more complex, layout-dependent text or page-based material. Acrobat files can be distilled from Postscript by the Publisher, if necessary.
- GIF or JPEG for still graphics. Graphics supplied as EPS or TIFF are also acceptable.
- MPEG or AVI for moving graphics.

Subsequent requests for changes are generally unacceptable, as for printed papers. A charge may be levied for this service.

Video Imaging: For the on-line version of the Journal the submission of illustrative video is encouraged. Authors proposing the use such media should consult with the Editor during manuscript preparation.

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

6. GRAPHICAL ABSTRACT

Authors are invited to submit a graphical abstract along with their manuscript to be published in the International Endodontic Journal's:

- Online table of contents.
- Content alert emails.
- Within the article.

The graphical abstract should visually convey the key findings of the report and present a clear message to the reader. It should be used as a means of attracting the readers' attention and promoting further engagement with the article.

To create an effective graphical abstract, authors should focus on presenting to the reader what they can learn from the report, communicating only the key message.

Guidelines for designing a Graphical Abstract:

1. Creating a graphical abstract does not mean just copying and pasting a figure from the manuscript.
2. Use text sparingly, so the graphical abstract does not become cluttered, but ensure that you have clearly stated the purpose of the report, research design, clinical case and the outcome of the study or case. Use language consistent with terms and definitions in the article that are free of editorialization (personal opinion) or bias.

3. Use only images that you have a legal right to use. Authors are responsible for obtaining permission to use any images that they include from outside sources, including articles, web pages, stock photo sites or Google image searches. Any

needed permissions must be submitted along with your graphical abstract or identified in the Acknowledgements section of your manuscript.

4. Exclude imagery that can be viewed as advertisement, such as trade names, logos, or images of trademarked items.

5. The Graphical Abstract should be submitted along with the manuscript through our ScholarOne platform and uploaded with the file designation “Graphical Abstract”.

6. Required file properties:

- o Resolution: 700 pixels (width) x 600 pixels (height).
- o Font size: at least 12pt.

- o Font: Calibri.

- o File size should not exceed 1MB.

7. A good example of how a graphical abstract should look can be seen

here: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.13141>

Please contact the editorial office at IEJeditor@cardiff.ac.uk if you have any questions.

7. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

7.1 Wiley Author Services

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

7.2 Copyright & Licensing

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License. Standard re-use and licensing rights vary by journal. Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC- BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND Creative Commons License.

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions.

7.3 Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. Manuscripts accepted 'in press' are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting and appear in PDF format only. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. The final copyedited and proofed articles will

appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

7.4 Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online/with their proofs included as a pdf. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email.

7.5 Early View

Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have

been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

7.6 Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

7.7 Wiley's Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

7.8 Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required

fields: Sheridan Printer. If you have queries about offprints please email Customer Service.

7.9 Author Services

For more substantial information on the services provided for authors, please see Wiley Author Services

- Submit an Article
- Get content alerts
- Subscribe to this journal

