

Jesse Augusto Pereira

**EFEITO DE ANÁLOGOS DE CURCUMINA,
IRRADIADOS OU NÃO POR LED, COMO
AGENTES ANTIMICROBIANOS E
INDUTORES DE PROLIFERAÇÃO E
MIGRAÇÃO CELULAR**

**Araçatuba - SP
2020**

Jesse Augusto Pereira

**EFEITO DE ANÁLOGOS DE CURCUMINA,
IRRADIADOS OU NÃO POR LED, COMO
AGENTES ANTIMICROBIANOS E
INDUTORES DE PROLIFERAÇÃO E
MIGRAÇÃO CELULAR**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Duque

Coorientadora: Prof^a Dr^a Letícia Helena Theodoro

**Araçatuba - SP
2020**

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436e Pereira, Jesse Augusto.
Efeito de análogos de curcumina, irradiados ou não por LED, como agentes antimicrobianos e indutores de proliferação e migração celular / Jesse Augusto Pereira. - Araçatuba, 2020
60 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque
Coorientadora: Profa. Leticia Helena Theodoro

1. Curcumina 2. Biofilmes 3. Anti-infecciosos 4. Testes de toxicidade I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados curriculares

Nascimento	20.08.1987 – São José do Rio Preto - SP
Filiação	José Pereira Neto Edi Pereira da Silva Pereira
2011-2017	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP.
2013-2014	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica com auxílio de bolsa UNESP
2014-2017	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica com auxílio de bolsa PIBIC-CNPq e FAPESP.
2018-2019	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio de bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.
2019-2020	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Comissão Examinadora

Defesa de Dissertação

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

Profa. Dra. Natália Leal Vizoto - Professora Associado do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Disciplina de Ciências Morfofuncionais do Sistema Imune do Instituto Anhanguera Educacional, Piracicaba.

Dra. Karina Sampaio Caiaffa – Pós-doutoranda do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba.

“Você nunca achará o arco-íris, se estiver olhando para baixo ”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que ele me proporcionou até agora e pelo que está por vir.

Agradeço à minha família que nunca mediram esforços para me ajudar.

Aos meus pais, Edi e José, sem eles todo esse caminho trilhado até aqui não teria o mesmo peso conquistado. E não falo somente por mim, mas pelos meus irmãos, que mesmo longe, ainda se propõem a fazer tudo aquilo que está ao alcance. Ao lado de vocês, tudo se torna mais fácil e agradável.

Aos meus irmãos, Emmanoel e Mariangelis, pelo apoio que sempre tivemos, estando próximos ou não.

A minha pequena sobrinha Isabella, que mesmo em pouco tempo mostrou um grande significado em nossas vidas.

Aos amigos que tive a felicidade de fazer em Araçatuba: Denis, Gabriel, Victória, Isabela, Tamires, Caio, Ricardo, Gabriel Gaban, Maria Clara, Maria Paula, Monique, Brenda. Vocês foram a minha família e minha base que o bom Deus pode me proporcionar longe de casa, e com toda a certeza do mundo, levarei cada um de vocês em meu coração.

Aos amigos que tive a felicidade de morar junto, obrigado pelo tempo convivido e aprendizado na qual tivemos que nos adequar a maneira de cada um.

A Professora Cristiane Duque pelo apoio e pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente, por ter me inspirado a seguir o caminho de pesquisador e pelo desbravamento de conhecimentos. Além de professora, é uma excelente amiga e espero que essa amizade possa durar por um longo tempo.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, Prof. Dr. Alberto Carlos B. Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan e Profª Drª. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, por todos os conhecimentos transmitidos.

A Profª. Drª. Letícia Helena Theodoro da disciplina de Periodontia por ter auxiliado nesse projeto, contribuindo com muito conhecimento e pelo equipamento utilizado.

Ao Prof. Dr. Luís Octávio Regasini e ao aluno Carlos Roberto Polaquini e toda equipe de trabalho do Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, São José do Rio Preto pelo desenvolvimento dos análogos de curcumina estudados. Obrigado pela parceria e por toda colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Odontopediatria Rafael, Gabriela, Vivian, Larissa, Warley, Thainara, pela convivência, em especial à Karina, Rafaela, Vanessa e Amanda, pelo tempo e comprometimento com as pesquisas, sem vocês esse trabalho não teria saído do papel. A amizade feita até aqui foi imprescindível.

À Banca do Exame Geral de Qualificação e à Banca de Defesa. Muito obrigado por toda contribuição no trabalho e pelos conhecimentos trocados.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria Ricardo, Mário e Luisinho. Por manterem a organização no laboratório; por toda a ajuda e dedicação. Muito obrigado.

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

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, por ter proporcionado ensino de qualidade, espaço físico e as oportunidades que foram possíveis desfrutar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa no primeiro ano do curso do mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa no segundo ano do curso de mestrado (processo 2018/10857-0).

Pereira JA. Efeito de análogos de curcumina, irradiados ou não por LED, como agentes antimicrobianos e indutores de proliferação e migração celular. [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2020.

Resumo Geral

O tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens com infecções pulpares/periapicais antes de completar a rizogênese ainda é um desafio para a Endodontia e a Odontopediatria. Relatos científicos têm mostrado que a curcumina (CUR), um fitoquímico polifenólico, apresenta diversas propriedades terapêuticas, entre as quais, amplo espectro de ação antimicrobiana e a capacidade de induzir a proliferação e migração celular. Além disso, devido à sua capacidade excitatória na presença de luz, a CUR também tem sido utilizada como fotossensibilizante em terapia fotodinâmica associada ao LED (*light emitting diode*), promovendo aumento dos seus efeitos biológicos. Uma forma de aumentar seu potencial terapêutico e reduzir algumas limitações do uso da CUR é a síntese de análogos a partir de pequenas modificações químicas na estrutura original, entretanto, mantendo sua capacidade fotossensibilizante. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme de análogos de curcumina sob a influência ou não do LED sobre microrganismos de interesse endodôntico e sua influência sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos da linhagem L-929. Uma série de compostos análogos de CUR (PCR-4 H, PCR-3 OH, PCR-4 OH, PCR-3 OCH₃, PCR-4 OCH₃, PCR-3 acetil, PCR-4 acetil) foram sintetizados pela metodologia de Pabon. A atividade antimicrobiana da CUR e seus análogos foi determinada pelo ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii*, *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*, sob a ação ou não do LED InGaN (nitreto de gálio e índio, com potência de saída de 100 mW/cm², ponta do LED com área de 0,78 cm², 60 s). A curcumina e seu análogo com melhor efeito antimicrobiano (PCR-3 OH) foi avaliado sobre o biofilme inicial (72h) e maduro (1 semana) dessas espécies em microplacas e sobre biofilmes multiespécies formados em túbulos dentinários por contagem das UFC/mL e por microscopia confocal, respectivamente, sob ação ou não do LED. Também foram avaliados quanto à citotoxicidade e a capacidade de induzir proliferação e migração em fibroblastos, por meio de ensaios de metiltetrazólio, azul de tripan e azul de Coomassie, respectivamente. Os dados foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$). Dos 7 análogos de curcumina sintetizados, PCR-3 OH foi o único composto que apresentou atividade bactericida quando testado sobre as bactérias de interesse endodôntico selecionadas. Seu efeito foi potencializado na presença do LED, variando entre as espécies bacterianas. A curcumina teve efeito bactericida para as espécies *S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*, e em algumas delas, foi independente do LED. Ambos os compostos reduziram o

crescimento dos biofilmes iniciais ou maduros, independente do LED. Entretanto quando irradiados, o efeito dos compostos variou de acordo com a espécie bacteriana, sendo que *A. israelii* e *S. mutans* foram os mais afetados. Ambos os compostos reduziram significativamente os biofilmes multiespécies quando comparados ao controle sem tratamento, sendo que melhor efeito foi observado para PCR-3 OH. A curcumina foi considerada citocompatível a partir de 0,039µg/mL e PCR-3 OH a partir de 0,019 µg/mL. Houve redução significativa na viabilidade celular quando os compostos foram irradiados com LED nas concentrações 0,039 e 0,019 µg/mL. O LED, dentro dos parâmetros testados, reduziu significativamente a viabilidade, a proliferação e a migração celular, independente do composto ou tempo de exposição. Conclui-se que PCR-3 OH apresentou atividade bactericida e sobre biofilmes simples e multiespécies de bactérias de interesse endodôntico superior à CUR, principalmente sob ação do LED. Entretanto, sua citocompatibilidade foi inferior à da CUR. A presença do LED afetou a viabilidade, proliferação e migração dos fibroblastos, mostrando que os parâmetros utilizados para fins antimicrobianos não foram adequados para aplicação em células eucarióticas.

Palavras-chave: curcumina, biofilmes, anti-infecciosos, testes de toxicidade.

Pereira JA. Effect of curcumin analogues, irradiated or not by LED, as antimicrobial agents and inducers of cell proliferation and migration. [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2020.

General Abstract

Endodontic treatment of young permanent teeth with pulp / periapical infections before completing rhizogenesis is still a challenge for Endodontics and Pediatric Dentistry. Scientific reports have shown that curcumin (CUR), a polyphenolic phytochemical, has several therapeutic properties, including a broad spectrum of antimicrobial action and the ability to induce cell proliferation and migration. In addition, due to its excitatory capacity in the presence of light, CUR has also been used as a photosensitizer in photodynamic therapy associated with LED (light emitting diode), promoting an increase in its biological effects. One way to increase its therapeutic potential and reduce some limitations of the use of CUR is the synthesis of analogues from small chemical modifications in the original structure, however, maintaining its photosensitizing capacity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm action of curcumin analogues under the influence or not of LED on microorganisms of endodontic interest and their influence on the viability, proliferation and migration of L-929 fibroblasts. A series of CUR analog compounds (PCR-4 H, PCR-3 OH, PCR-4 OH, PCR-3 OCH₃, PCR-4 OCH₃, PCR-3 acetyl, PCR-4 acetyl) were synthesized by Pabon's methodology. The antimicrobial activity of CUR and its analogs was determined by the Minimum Concentration Inhibitory (CIM) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM) assay on *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii*, *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*, with or without the InGaN LED (gallium and indium nitride, with output power of 100 mW / cm², LED tip with an area of 0.78 cm², 60 sec). Curcumin and its analog with the best antimicrobial effect (PCR-3 OH) were evaluated on the initial (72h) and mature (1 week) biofilm of these species in microplates and on multispecies biofilms formed in dentinal tubules by counting CFU / mL and by confocal microscopy, respectively, under the action or not of the LED. They were also evaluated for cytotoxicity and the ability to induce proliferation and migration in fibroblasts, using methyltetrazolium, trypan blue and Coomassie blue assays, respectively. The data were evaluated statistically (p <0.05). Of the 7 curcumin analogues synthesized, PCR-3 OH was the only compound that showed bactericidal activity when tested on selected bacteria of endodontic interest. Its effect was enhanced in the presence of LED, varying between bacterial species. Curcumin had a bactericidal effect for the species *S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei* and *F. nucleatum*, and in some of them, it was independent of the LED. Both compounds reduced the growth of the initial or mature biofilms, regardless of the LED. However, when irradiated, the effect of the compounds varied according to the bacterial species, with *A. israelii* and *S. mutans* being the most

affected. Both compounds significantly reduced multispecies biofilms when compared to the untreated control, with the best effect being observed for PCR-3 OH. Curcumin was considered cytocompatible from 0.039 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and PCR-3 OH from 0.019 $\mu\text{g} / \text{mL}$. There was a significant reduction in cell viability when the compounds were irradiated with LED at concentrations of 0.039 and 0.019 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The LED, within the parameters tested, significantly reduced cell viability, proliferation and migration, regardless of the compound or time of exposure. It is concluded that PCR-3 OH showed bactericidal activity and on simple and multispecies biofilms of bacteria of endodontic interest superior to CUR, mainly under the action of LED. However, its cytocompatibility was lower than that of the CUR. The presence of the LED affected the viability, proliferation and migration of fibroblasts, showing that the parameters used for antimicrobial purposes were not suitable for application in eukariotic cells.

Keywords: curcumin, biofilms, anti-infective agents, toxicity tests.

Lista de Figuras

- | | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1 | Planejamento das estruturas químicas dos análogos de curcumina. | 45 |
| Figura 2 | Estrutura química da curcumina e seus análogos. | 46 |
| Figura 3A-E | Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina sobre biofilmes simples iniciais (72h), na presença ou não de LED. O controle foi realizado somente sem LED. Concentração PCR-3 OH/curcumina = 0,625mg/mL. Dados apresentados em médias/desvios-padrão.
^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). | 47 |
| Figura 4A-E | Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina sobre biofilmes simples maduro (1 semana), na presença ou não de LED. O controle foi realizado somente sem LED. Concentração PCR-3 OH/curcumina = 0,625mg/mL. Dados apresentados em médias/desvios-padrão.
^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). | 48 |
| Figura 5A-E | Efeito do composto PCR-3 OH e curcumina (CUR) sobre biofilme misto (a partir de amostras de biofilme supra/subgingival humano) formado no interior dos túbulos dentinários. Concentração PCR3-OH/CUR = 0,625mg/mL. Dados apresentados em médias/desvios-padrão.
^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença | 49 |

estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

- Figura 6A-F** Imagens 2-D obtidas em microscopia confocal representativas dos biofilmes multiespécies formados no interior dos canais radiculares a partir de amostras de biofilme supra e subgingival humano. A – controle; B – tratamento com CHX 0,5 mg/mL; C – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL; D – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL, sob ação do LED; E – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL; F – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL, sob ação do LED. 50
- Figura 7A-F** Imagens 2-D obtidas em microscopia confocal representativas dos biofilmes formados no interior dos canais radiculares a partir de amostras de canais radiculares humanos com necrose pulpar. A – controle; B – tratamento com CHX 0,5 mg/mL; C – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL; D – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL, sob ação do LED; E – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL; F – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL, sob ação do LED. 51
- Figura 8** Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina sobre a viabilidade de fibroblastos da linhagem L-929. Dados apresentados em médias/desvios-padrão. 52
- ^a Letras minúsculas diferenças mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada concentração separadamente, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

- Figura 9** Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina sobre a proliferação de fibroblastos da linhagem L-929. Dados apresentados em médias/desvios-padrão. 53
- ^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada concentração separadamente, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).
- Figura 10** . Box-plot representando as porcentagens de migração celular (em relação ao controle – DMEM 100%), após estímulo com os compostos PCR-3 OH e Curcumina (CUR) por 24h. 54
- ^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada concentração separadamente, segundo os testes de Mann-Whitney ($p < 0,05$).
- Figura 11A-N** Imagens representativas obtidas por microscopia de luz invertida e coloração com azul de Coomassie de ensaios de migração com células L-929 submetidos aos tratamentos por 24h. A: PCR-3 OH 0,019 μ g/mL; B: PCR-3 OH 0,009 μ g/mL; C: PCR-3 OH 0,004 μ g/mL; D: PCR-3 OH 0,019 μ g/mL LED; E: PCR-3 OH 0,009 μ g/mL LED; F: PCR-3 OH 0,004 μ g/mL LED; G: CUR 0,019 μ g/mL; H: CUR 0,009 μ g/mL; I: CUR 0,004 μ g/mL; J: CUR 0,019 μ g/mL LED; K: CUR 0,009 μ g/mL LED; L: CUR 0,004 μ g/mL LED; M: DMEM 0h; N: DMEM 24h. 55

Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores de CIM (CBM) (em mg/mL) para os compostos curcumina e PCR-3 OH.	44
-----------------	---	----

Sumário

Resumo	18
Introdução	19
Material e Métodos	22
Resultados	32
Discussão	34
Conclusão	38
Agradecimentos	38
Referências	39
Tabelas	44
Figuras	45
Anexo	56

Efeito de análogos de curcumina, irradiados ou não por LED, como agentes antimicrobianos e indutores de proliferação e migração celular.

Autores:

Jesse Augusto Pereira¹, Vanessa Rodrigues dos Santos¹, Karina Sampaio Caiaffa¹, Rafaela Laruzo Rabelo¹, Gabriel Flores Abuna², Letícia Helena Theodoro³, Carlos Roberto Polaquini⁴, Luís Octávio Regasini⁴, Cristiane Duque¹

¹Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil.

²Departamento de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, Brasil.

³Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil.

⁴Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências do Ambiente, Instituto de Biociências, Ciências Humanas e Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José do Rio Preto, Brasil.

** Autor de correspondência:*

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

Telefone: 55-18-36363315.

E-mail: cristianeduque@yahoo.com.br, cristiane.duque@unesp.br

Palavras-chave: curcumina, curcuminoide, atividade antimicrobiana, biofilme, citotoxicidade.

Resumo

Objetivos: Avaliar a ação antimicrobiana/antibiofilme de análogos de curcumina (CUR), sob a influência ou não do LED, sobre microrganismos de interesse endodôntico e sua influência sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos.

Material e Métodos: Análogos de CUR foram sintetizados pela metodologia de Pabon e determinadas as Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum*. O efeito da CUR e seus análogos foi avaliado sobre o biofilme inicial (72h) e maduro (1 semana) dessas espécies em microplacas e sobre biofilmes multiespécies formados em túbulos dentinários (a partir de amostras de biofilme supra/subgengival ou de canais radiculares com necrose pulpar) por contagem das UFC/mL e por microscopia confocal, respectivamente, sob a ação ou não do LED. A CUR e seu análogo com melhor efeito antimicrobiano (PCR-3 OH) foram avaliados quanto à citotoxicidade e a capacidade de induzir proliferação e migração em fibroblastos, por meio de ensaios de metiltetrazólio, azul de tripan e azul de Coomassie, respectivamente. Os dados foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$).

Resultados: Dos 7 análogos de CUR, PCR-3 OH foi o único que apresentou atividade bactericida sobre todas as bactérias testadas. Seu efeito foi potencializado na presença do LED, variando entre as espécies bacterianas. CUR e PCR-3 OH reduziram o crescimento dos biofilmes simples iniciais ou maduros, independente da presença do LED, porém, quando irradiados, *A. israelii* e *S. mutans* foram os mais sensíveis. Ambos os compostos reduziram significativamente os biofilmes multiespécies nos túbulos dentinários. A CUR foi considerada citocompatível a baixo de $0,039 \mu\text{g/mL}$ e PCR-3 OH a partir de $0,019 \mu\text{g/mL}$. O LED, dentro dos parâmetros testados, reduziu significativamente a viabilidade, a proliferação e a migração celular, independente do composto ou tempo de exposição.

Conclusão: PCR-3 OH apresentou atividade bactericida e sobre biofilmes simples e multiespécies de bactérias de interesse endodôntico superior à CUR, principalmente sob ação do LED. Entretanto, sua citocompatibilidade foi inferior à da CUR. A presença do LED reduziu a viabilidade, proliferação e migração dos fibroblastos, mostrando que os parâmetros utilizados para fins antimicrobianos não foram adequados para aplicação em células eucarióticas.

1. Introdução

Um grande desafio clínico para a Odontopediatria e a Endodontia é o tratamento de dentes permanentes jovens que sofreram danos pulpares irreversíveis. Mesmo completando a erupção na cavidade bucal, os canais e ápices radiculares do dente permanente ainda não estão completos e se ocorrer um trauma ou infecção, esses processos podem ser interrompidos. O tratamento endodôntico objetiva manter a integridade da raiz e também prevenir ou resolver doenças periapicais pela eliminação dos microrganismos, toxinas e de suas fontes de nutrientes provenientes do sistema de canais radiculares (Young et al., 2007). Tratando-se dos dentes permanentes jovens, o tratamento endodôntico deve utilizar substâncias que auxiliem na resolução dos sinais e sintomas das doenças pulpares/periapicais e não apresentem toxicidade permitindo a continuidade do desenvolvimento radicular, por meio da preservação da bainha epitelial de Hertwig (Hargreaves et al., 2008; Iglesias-Linares et al., 2013).

Mesmo que a instrumentação associada às soluções irrigadoras, durante o preparo químico-mecânico endodôntico convencional, reduza drasticamente a microbiota presente no interior dos canais radiculares, a permanência de microrganismos em razão da complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e em consequência da resistência destes ao tratamento químico-mecânico pode levar ao desenvolvimento de infecções persistentes ou secundárias (Siqueira et al., 2007; Siqueira e Roças, 2009). O desenvolvimento ou a persistência de lesões periapicais após o tratamento endodôntico tem sido atribuído à virulência de bactérias e fungos no sistema de canais radiculares e/ou tecidos periapicais (Nair et al., 1999; Hancock et al., 2001). Muitos estudos têm revelado que as bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas são mais frequentes nesses casos, incluindo *Streptococcus spp.*, *Lactobacilos spp.*, *Actinomyces spp.* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Enterococcus faecalis*, entre outros (Sakamoto et al., 2008; Siqueira e Roças, 2009). Barbosa-Ribeiro et al. (2016) detectaram 70 espécies de bactérias Gram-positivas em canais infectados, com destaque para *E. faecalis* nos casos de insucesso endodôntico. Espécies bacterianas Gram-negativas, comuns nas infecções primárias, também podem permanecer após o tratamento químico-mecânico, como *Fusobacterium nucleatum* (Siqueira e Roças, 2009).

Visando obter novos compostos que apresentem amplitude terapêutica, as propriedades dos fitoquímicos vêm sendo largamente estudadas. A curcumina é um pigmento amarelo isolado dos 5 rizomas da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), uma espécie vegetal de amplo emprego culinário e medicinal, sendo comumente conhecida como “açafraão-da-índia”, “açafraão-da-terra”, “cúrcuma”, “turmérico” (Anand et al., 2008). Tem sido relatado que a curcumina é um potente agente anti-inflamatório e antioxidante, e vem sendo empregada no tratamento de uma variedade de desordens hepáticas, sinusite e até em tumores (Receno et al., 2015; Wang et al., 2015). Além disso, a curcumina apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo fungos, como espécies do gênero *Candida* (Neelofar et al., 2011) e demonstrando ação contra espécies bacterianas Gram-positivas, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, bem como Gram-negativas, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia enterocolitica* (Selvakumar & Venkataraman, 2010).

Estudo comparou o efeito de soluções antimicrobianas contra biofilme de *E. faecalis* formado sobre substrato dentário, demonstrou que a curcumina teve ação superior a clorexidina, e embora tenha tido menor atividade antibacteriana que o hipoclorito de sódio (3%), entretanto, devido ao potencial citotóxico dos outros antimicrobianos, a curcumina poderia ser uma alternativa natural interessante para propósitos endodônticos (Neelakantan et al., 2013). Devido à sua capacidade excitatória na presença de luz, em amplo espectro de 300-500 nm, a curcumina tem sido utilizada como fotossensibilizante em diversas terapias fotodinâmicas (PDT, photodynamic therapy) (Theodoro et al., 2017). A PDT apresenta algumas vantagens como pelo fato de sua aplicação ser local, limita a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e evita efeitos sistêmicos ou a microbiota normal, além disso, não apresenta alvos específicos para atingir a célula microbiana, podendo causar danos múltiplos nas estruturas celulares, reduzindo risco de cepas resistentes (Konopka & Goslinki, 2007). Alguns relatos mostram que a curcumina gera oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de causar danos à membrana ou ao DNA celular e conseqüentemente a morte celular bacteriana (Chignell et al., 1994; Bruzell et al., 2005).

Em Odontologia, a PDT tem sido indicada para promover a desinfecção microbiana no tratamento de periodontite, cárie dentária, doenças endodônticas, entre outras enfermidades odontológicas (Paschoal et al., 2013; Garcez et al., 2015; Theodoro et al., 2017). Pode-se utilizar laser de comprimento de onda específico ou LED (blue light emitting diode) como ativador do fotossensibilizante. Recentemente, Neelakantan et al. (2015) avaliaram o efeito de vários agentes antimicrobianos contra biofilme de *E. faecalis* cultivado em canais radiculares e observaram que em as ambas as profundidades de 200 e 400 microns, nenhum crescimento foi observado para o grupo de curcumina ativada pela luz, produzindo maior efeito que quando ativada por agitação ultrassônica. Além das propriedades antimicrobianas, é importante que um agente para aplicação endodôntica, seja para irrigação ou como medicamento intracanal, não apresente efeito citotóxico e se possível, estimule a proliferação e migração de células remanescentes em procedimentos de regeneração em dentes permanentes jovens (Schneider et al., 2014).

A ampla comunicação entre o canal radicular e os tecidos periapicais nestes dentes imaturos, via forame apical, pode fornecer a vascularização necessária para manter a viabilidade de células, como fibroblastos, células pulpares remanescentes, células tronco e até células epiteliais da bainha de Hertwig, desde que os agentes utilizados para tratamento endodôntico não sejam citotóxicos ou até promovam a sua proliferação (Tsukiboshi et al., 2017). Mandrol et al. (2016) mostraram que a curcumina foi capaz de manter a viabilidade celular e promover a proliferação de fibroblastos da polpa dental mesmo em altas concentrações. Outros curcuminoides também tem promovido efeito na re-epitelização, aumento da neovascularização e aumento do padrão de migração de células, como fibroblastos e macrófagos em modelos em animais (Sidhu et al., 1999). Quando atua como fotossensibilizante em terapia fotodinâmica, os parâmetros do LED influenciam diretamente na citotoxicidade da curcumina. Estudo demonstrou que a citotoxicidade da curcumina aumentou quando fibroblastos gengivais humanos foram tratados mais de uma vez (2x de 30s) com PDT, embora em menor tempo (Pourhajibagher et al., 2016).

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

água e relativa baixa absorção e disponibilidade *in vivo* (Mishra et al., 2005; Cao et al., 2014). Além disso, muito esforço tem sido feito para desenvolver drogas mais potentes, eficientes e bem tolerado pelo organismo. Desta forma, modificações químicas sintéticas tem promovido o desenho de novos compostos a partir de fitoterápicos com potente atividade antibacteriana e mínimos efeitos tóxicos (Polaquini et al., 2016; Polaquini et al., 2017). A diacetilcurcumina, um derivado da curcumina sintetizado a partir da conversão dos grupos hidroxila (-OH) por grupos acetila (-OCOCH₃) foi avaliado contra *Mycobacterium tuberculosis* (Changtam et al., 2010) e contra biofilme de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, apresentando baixa toxicidade em *Galleria mellonella larvae* (Sardi et al., 2017). Outro estudo demonstrou potente efeito inibitório de um análogo de curcumina carboxílico chamado 2d sobre diversas espécies Gram positivo, incluindo *S. aureus* resistente a meticilina. Além disso, 2d apresentou menor efeito inibitório sobre células humanas quando comparado às bactérias (Groundwater et al., 2017). Não foram encontrados estudos avaliando análogos de curcumina, como agentes fotossensibilizantes em terapia com LED, quanto ao seu potencial antimicrobiano, citotóxico ou indutor de proliferação/migração celular. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme de análogos de curcumina, sob a influência ou não do LED, sobre microrganismos de interesse endodôntico e sua influência sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos.

2. Material e Métodos

Os experimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP. Processo (CAAE #92946918.7.0000.5420) e (CEP 01195-2017).

2.1. Compostos químicos e controles

Neste presente estudo, foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana a curcumina e 7 compostos análogos de curcumina cedidos pelo Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, coordenador do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, São José do Rio Preto. A síntese, purificação e identificação dos

compostos foi realizada pela equipe do referido professor (principalmente pelo aluno Ms. Carlos Roberto Polaquini) com apoio da FAPESP, processo 2016/06401-5. Os análogos de curcumina (curcuminoides) foram planejados como mostra a **Figura 1**, de modo a verificar a influência da posição de grupos doadores de elétrons sobre a atividade antimicrobiana. Foram selecionados os grupos hidroxila (–OH) e metoxila (–OCH₃), os quais estão presentes na estrutura da curcumina e o grupo acetila (–OCOCH₃).

Os análogos de curcumina foram sintetizados pela metodologia de Pabon com pequenas modificações (Pabon, 1964; Konno et al., 2004, Polaquini, 2016). Para a purificação dos compostos foram utilizadas técnicas de cromatografia em coluna de fase normal e de permeação em gel. As estruturas dos análogos de curcumina foram confirmadas por meio de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) e Carbono Treze (RMN de ¹³C) em Espectrômetro Bruker Avance III de 14,0 Tesla do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular – IBILCE/UNESP. A **Figura 2** mostra a estrutura química dos análogos de curcumina e seus análogos.

2.1.1. Preparo dos compostos e controles

A curcumina e seus análogos foram diluídos em 5% de dimetilsulfóxido, (DMSO Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 30 mg/mL (solução estoque). Como controle dos experimentos microbiológicos foi utilizado o DMSO e o digluconato de clorexidina (Farmácia Manipullis –Araçatuba, SP- Brasil) em água deionizada estéril na concentração de 20 mg/mL (solução estoque) e posteriormente filtrada em filtro Millipore 0.2 µm (Kasvi, Curitiba-PR, Brasil).

2.2. Cepas microbianas padrão e condições de crescimento

Para a avaliação das atividades antimicrobiana e antibiofilme dos compostos foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (IAL#523), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586). As cepas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Os meios de cultura usados para crescimento de cada espécie bacteriana foram os seguintes: Mitis Agar Salivarius Agar

(Difco, Kansas City, MO, USA) com 0,2U/mL de bacitracina para *S. mutans*, MRS Rogosa Agar (Difco) para *L. casei*, Brain Heart Infusion Agar – BHIA (Difco) para *A. israelii* e *E. faecalis*. Para *F. nucleatum*, o meio utilizado foi BHIA contendo 5mg/L de hemina, 5mg/mL de menadiona e 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas a 37°C em condições de anaerobiose para *F. nucleatum* (sistema de anaerobiose AnaeroGen - Oxoid, Hampshire, UK) e para as demais a 37° C e 5% de CO₂.

2.3. Coletas das amostras biológicas

2.3.1. Amostras clínicas de biofilme supra e subgingival

Amostras de biofilme supragengival e subgingival foram coletadas de 3 adultos saudáveis entre 20-30 anos, após a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FOA/UNESP. O biofilme supragengival foi coletado de dentes íntegros (sem lesões de cárie ou presença de doença periodontal) seguindo metodologia descrita por Yang et al. (2016), com o auxílio de alças de plástico descartáveis estéreis (Cral, Cotia, SP, Brasil) e o biofilme subgingival por meio de cones de papel estéreis (n° 25, Tanari, Manaus, AM, Brasil), nas faces mesial, distal, vestibular e lingual de primeiros molares permanentes totalmente erupcionados. As amostras do biofilme supra e subgingival do mesmo paciente foram inseridas em tubo contendo meio BHI caldo e incubadas em condições de anaerobiose a 37° C por uma semana.

2.3.2. Amostras clínicas de biofilme dos canais radiculares

Amostras de biofilme dos canais radiculares foram coletadas de 3 adultos saudáveis entre 20-30 anos, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FOA/UNESP. O biofilme dos canais radiculares foi coletado de primeiros molares permanentes com as paredes da câmara pulpar intacta e estrutura dentária suficiente para realização do isolamento absoluto, diagnosticados com periodontite apical ou perirradicular (polpas necrosadas e presença de lesão radiolúcida na região periapical e/ou perirradicular), seguindo a metodologia descrita por Roças et al. (2016). Após o isolamento absoluto foi realizada uma desinfecção com clorexidina 0,12% do campo operatório. Os pacientes já estavam sob tratamento endodôntico na clínica de Endodontia da FOA - UNESP e foi realizada a coleta das amostras de todos os canais radiculares com o auxílio de cones de papel estéreis (n° 25, Tanari, Manaus, AM,

Brasil), uma única vez antes do início do tratamento, sem interferir no decorrer do tratamento que estava sendo realizado. As amostras do biofilme dos canais radiculares do mesmo paciente foram inseridas em tubo contendo BHI caldo e incubadas em condições de anaerobiose a 37° C por uma semana.

2.4. Triagem dos compostos quanto à atividade antimicrobiana

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Cada análise descrita a seguir foi realizada em três dias independentes. Inicialmente, avaliaram-se todos os compostos sem a influência do LED e em seguida, somente aqueles que apresentaram ação antibacteriana foram submetidos aos testes de CIM e CBM novamente, porém sob ação do LED. O controle positivo de cada experimento foi o digluconato de clorexidina (CHX, Sigma-Aldrich, USA) e o controle negativo foi o meio de cultura sem os compostos. Brevemente, curvas de crescimento foram realizadas para cada microrganismo (*S. mutans*, *E. faecalis*, *L. casei*, *A. israelii* e *F. nucleatum*) com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para este atingir sua fase de maior multiplicação celular (fase logarítmica ou exponencial). Os ensaios de CIM foram medidos pelo método de microdiluição, baseados nas normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute - M7-A9, 2012) com algumas modificações. Culturas das espécies bacterianas mencionadas no item 2.2 foram repicadas em meio caldo BHI (Difco) por 24h ou mais, dependendo do tempo de crescimento de cada microrganismo, a 37° C. Quando a cultura atingiu a metade da fase logarítmica, as células foram separadas por centrifugação a 5000xg por 5 minutos a 4° C. Estas foram lavadas e ressuspendidas em tampão fosfato de sódio – PB (10 mM, pH. 6,8). Em seguida, o número de células foi ajustado utilizando-se Mueller-Hinton (MH) caldo 2x concentrado para obtenção de 1-5 x10⁵ UFC/mL (Unidades Formadoras de colônias/mL). Os compostos foram diluídos seriadamente em meio de cultura MH e em seguida, inserida a cultura bacteriana com a concentração ajustada.

Após incubação por 24h a 37° C, as placas de microtitulação foram analisadas a 550nm em um leitor de Microplacas modelo 3550-UV (Biorad do Brasil) após a aplicação de uma solução de rezasurina (Sigma) a 5µg/mL por 3 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do composto ou clorexidina que não houve

crescimento detectável (coloração azul da viragem da resazurina). Os meios contendo a CIM e duas concentrações maiores foram diluídas seriadamente e plaqueados em MH ágar e incubados a 37° C por 48h para todos os microrganismos, exceto *F. nucleatum*, incubado em anaerobiose por 5 dias. As colônias foram contadas com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA) e determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A CBM foi considerada quando o composto eliminou mais de 99% das bactérias. Paralelamente, como mencionado, todos esses ensaios foram repetidos em outras placas escuras com os compostos que apresentaram CIM/CBM mantidos por 10 minutos (pré-irradiação) e em seguida, expostos a irradiação com LED InGaN (nitreto de gálio e índio (Kon-lux Kondortech Dental Equipment Ltda., São Carlos, SP, Brazil) com um comprimento de onda de 465-485nm e potência de 600 mW/cm² (Neelakantan et al., 2015). A ponta do LED foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo dos poços com área de 0,78 cm² com potência de saída de 100mW/cm², comprovada com medidor de potência (Power meter Demetron Research Corp. Danbury, CT, EUA) e aplicado por 60 segundos, totalizando uma densidade de energia de 7,69 J/cm². Houve uma distância de dois poços (para cima/baixo/lados) para não haver a interferência do LED aplicado de um poço para outro. Da mesma maneira, após a irradiação do LED, as placas foram incubadas por 24h e procedeu-se a determinação do CIM e CBM para os compostos, sob a influência prévia do LED.

2.5. Efeito dos compostos sobre biofilme simples e misto

2.5.1. Avaliação da viabilidade do biofilme simples por contagem das UFC/mL

Os ensaios foram conduzidos em biofilmes isolados de *E. faecalis*, *S. mutans*, *L. casei*, *A. israelii* e *F. nucleatum*. Todos os compostos foram avaliados na concentração de 0,625 mg/mL baseada nos resultados obtidos para CIM/CBM (a mais alta obtida). Os ensaios de biofilme foram realizados de acordo com Massunari et al. (2017), com n=5/experimento em três dias independentes (n final=15). Inicialmente, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 5000xg a 4° C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado duas vezes em solução salina e ressuspenso em BHI caldo para ajuste da concentração inicial (1-5x10⁶ UFC/mL). Microplacas de 96 poços de fundo em U foram pré-tratadas com 150 µL de saliva artificial (Composição: 800 mL

de água deionizada, 1,6 g de extrato de levedura, 4 g de peptona, 0,28 g de NaCl, 1,6 g de glicose ou 3,2 g de sacarose, 0,16 g de CaCl_2 , 0,16 g de KCl e 0,8 g de mucina) durante um período de 4 h a 37° C na estufa de 5% CO_2 (*coating phase*). Após o período de incubação, a saliva foi removida e 20 μL de cada cultura bacteriana foram inoculados em cada um dos poços contendo 180 μL de caldo BHI suplementado com 0,5% de glicose. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 por um período de 72h (biofilme inicial) ou por um período de uma semana (biofilme maduro), havendo a troca do meio a cada 72h, nesse último caso. E somente para *F. nucleatum*, as placas foram incubadas em sistema de anaerobiose (Yang et al., 2016).

Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com solução salina estéril (NaCl a 0,9%) para subsequente adição de 200 μL dos compostos e controles em cada poço. Digluconato de clorexidina (10x CBM) foi considerada controle positivo, bem como biofilme em meio de cultura sem agentes antimicrobianos como controle negativo. As microplacas foram incubadas durante 24h. Paralelamente, todos esses ensaios foram repetidos em outras placas com os mesmos compostos sendo expostos à irradiação com LED por 60 segundos, com os mesmos parâmetros descritos no item 2.5, seguida por incubação por 24h. Após esse período, as soluções dos compostos/controles foram removidas, o biofilme foi lavado com solução salina por 1 min e em seguida, 100 μL de nova salina foi inserida nos poços e o biofilme mecanicamente removido, diluído seriadamente e plaqueado em meio BHI ágar. As placas foram incubadas por 48h para posterior determinação do número de UFC/mL.

2.6. Avaliação da viabilidade dos biofilmes multiespécies por microscopia confocal

2.6.1. Preparo dos espécimes de dentina e contaminação bacteriana

O ensaio de biofilme misto para análise em Microscopia Confocal foi realizado de acordo com Ma et al. (2011). As amostras (n=3/grupo/tipo de biofilme) foram preparadas a partir de raízes de incisivos bovinos. Esses dentes foram mantidos em solução de NaOCl 0.01% antes do uso. Um bloco de dentina radicular com comprimento de 4mm foi seccionado horizontalmente de cada dente a 1 mm de distância da junção cimento-esmalte com um disco de diamante de 0.6 mm (Isomet 5000; BuehlerLtd, LakeBluff, IL) a 1000 rpm sob irrigação com água. Em cada bloco de

dentina cilíndrico foi realizado um pequeno sulco no meio do espécime com auxílio de uma broca esférica pequena (Tulsa Dentsply) em baixa rotação e então fraturados em duas metades semi-cilíndricas. As superfícies externas das metades semi-cilíndricas foram desgastadas com lixa de papel carbide com gramatura de 600 (Carbine, BuehlerLtda) até uma espessura padrão de 2 mm e para remover o cimento da superfície radicular. Os espécimes de dentina foram então desgastados com broca fina a 300rpm até atingirem o seguinte tamanho: 4x4x2 mm. A camada de *smear layer* de ambos os lados da espécie foi removida pela imersão em solução com EDTA 17% por 4 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, os espécimes foram lavados por 1 min com água destilada, esterilizados e inseridos em um microtubo com o lado do canal (pulpar) para cima. Qualquer gap entre o espécime e a parede interna do microtubo foi selado com resina composta e polimerizada por 20s. A contaminação dos espécimes de dentina radicular foi realizada com: 1) o *pool* das culturas de biofilme supra/subgingival (item 2.3.1) e 2) pool das culturas de biofilme dos canais radiculares dos voluntários (item 2.3.2). As culturas foram centrifugadas e o número de UFC foi ajustado em 3×10^6 UFC/mL. Nos microtubos com os espécimes de dentina, foram inoculados 500 μ L da cultura microbiana em meio BHI caldo. Os microtubos foram centrifugados em 1400xg, 2000xg, 3600xg e 5600xg nessa sequência, duas vezes cada, por 5 minutos. Uma alíquota fresca da cultura microbiana foi adicionada entre cada centrifugação e a antiga descartada. Todos os microtubos foram incubados a 37° C por 14 dias, em condições de anaerobiose. A troca do meio de cultura foi realizada 1 vez por semana.

2.6.2. Desinfecção dos espécimes de dentina

Os espécimes de dentina foram removidos dos microtubos e lavados com água destilada estéril por 1 minuto. As superfícies externas (lado do cimento) dos espécimes foram revestidas com esmalte para unha. Os espécimes foram randomizados e divididos em grupos: 1) controle 1 - água estéril; 2) controle 2 - CHX (0,5 mg/mL), 3) Curcumina 0,625mg/mL; 4) Curcumina 0,625 mg/mL com LED; 5) PCR-3 OH 0,625 mg/mL; 6) PCR-3 OH 0,625mg/mL com LED. Cada espécime foi imerso em 350 μ L de cada solução por 48h, com agitação inicial de 1h. Todos os grupos com LED foram repetidos em placas diferentes seguindo os mesmos parâmetros descritos no

item 2.5. Em seguida, os espécimes foram lavados com água estéril por 1 minuto e então fraturados em duas novas metades para observação da superfície longitudinalmente aos canais dentinários visíveis por Microscopia Confocal.

2.6.3. Análise em Microscopia Confocal de Varredura a Laser

As análises em Microscopia Confocal foram realizadas na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP. Os espécimes de dentina fraturados foram corados com o corante fluorescente LIVE/DEAD *Bac Light 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 490/635 nm 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 2D adquiridas pelo software LAS AF Leica Microsystems usando a resolução de 1024x1024 pixels. A proporção de células mortas nas imagens 2D 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 1.48 (NIH, Bethesda, MA, USA).

2.7. Efeito dos compostos sobre a viabilidade de fibroblastos

2.7.1. Cultivo celular

Os fibroblastos da linhagem L-929 foram cedidos pelo Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio da FOAr/UNESP e cultivados de acordo com Caiiffa et al. (2017). Os fibroblastos foram cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; Gibco) e 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (Gibco) em incubadora umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar a 37° C (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). As culturas celulares foram subcultivadas a cada 2 dias até atingir a formação de uma monocamada com um número adequado de células para os ensaios subsequentes.

2.7.2. Análise da viabilidade celular

Este ensaio foi conduzido conforme estudo de Caiaffa et al. (2017). As células foram submetidas ao tratamento com tripsina (TrypLE™ Express, Life Technologies Inc.) por 5 min a 37° C. Em seguida, após adição de DMEM, as células foram colhidas por centrifugação (3000xg por 5 min), suspensas em meio DMEM fresco, semeadas em uma microplaca de 96 poços (200µL/poço, 5x10⁵ células/mL) e incubadas por 24h a 37° C numa atmosfera com 5% de CO₂ para permitir a aderência celular antes da estimulação. Em seguida, as células foram estimuladas com os compostos curcumina e seu análogo PCR-3 OH por 24h, em concentrações decrescentes (0,625 – 0,004 µg/mL). O controle do experimento foi o DMEM. Paralelamente, todos esses ensaios foram repetidos em outras placas com os mesmos compostos expostos à irradiação com LED com os mesmos parâmetros descritos no item 2.5. O ensaio colorimétrico de metiltetrazólio (MTT) foi utilizado para avaliar o metabolismo celular pela demonstração citoquímica da atividade da desidrogenase succínica (SDH), que é uma medida da respiração mitocondrial das células.

Após o período de 24h, o meio de cultura foi aspirado e 90µL de DMEM fresco (sem soro fetal bovino) e 10µL de solução de MTT (5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato) (Sigma-Aldrich) foram adicionados e incubados a 37° C por 4h. Posteriormente, o meio de cultura com solução de MTT foi aspirado e os cristais de formazan, resultantes da clivagem do anel de sal MTT pela enzima SDH, foram solubilizados com solução de isopropanol acidificado (0,04 N HCl). Utilizou-se um leitor de microplacas (BIO-RAD, modelo 3550-UV, Hercules, CA, EUA) para avaliar a viabilidade celular proporcional ao valor de absorbância determinado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 570nm. Os valores obtidos foram calculados para fornecer um valor único para cada poço. As médias foram calculadas para os grupos e transformadas em porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle negativo (DMEM), que foi definido como tendo 100% de metabolismo celular.

2.8. Efeito sobre a proliferação celular

Os ensaios de proliferação celular foram conduzidos como descrito no item 2.7.2., porém somente com os compostos nas concentrações consideradas não citotóxicas pelo teste de MTT (0,019; 0,009; 0,004µg/mL, com e sem LED). As células

foram coletadas nos tempos 6h, 12h e 24h após a exposição e coradas com azul de trypan (Life Technologies) e a contagem das células foi realizada por meio de uma contadora digital (Biorad) (Gaudin et al., 2018).

2.9. Efeito sobre a migração celular

Os ensaios de migração celular foram conduzidos como descrito no item 2.7.2., porém, em uma placa contendo um dispositivo em forma de pino (VP Scientific VP-408FH, San Diego, CA) inserido em cada poço e somente com os compostos nas concentrações consideradas não citotóxicas pelo teste de MTT (0,019; 0,009; 0,004µg/mL, com e sem LED). Esse dispositivo foi utilizado para criar áreas padronizadas no centro dos poços onde não houve crescimento celular (áreas de “feridas”). Após 24h, o dispositivo foi removido de cada poço delicadamente e os poços foram expostos a ação dos antimicrobianos por 24h. Após esse período, os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com solução de 3,7% de formaldeído + 0,2% de Tritox-X100, 1X PBS por 30 min. Em seguida, as células foram coradas com 0,25% azul de Coomassie + metanol 50% e ácido acético a 10% e deixadas para secar. As placas foram fotografadas e analisadas pela contagem de células que migraram a partir da área da ferida para o centro dela por meio do programa NIH-Image J e os valores expressos % de células em relação ao controle (DMEM -100%) (San Miguel et al., 2011).

2.10. Análise dos resultados

Os dados de contagem microbiana (UFC/mL) foram transformados em logaritmos (\log (UFC/mL) e adicionado +1 pois algumas amostras apresentaram valores iguais a zero. Os dados obtidos para metabolismo celular (método MTT) e migração foram transformados em porcentagem (%), considerando a média do controle (sem antimicrobianos) como 100%. Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por ANOVA (One-way/Two-ways ou Two-way) seguido pelo teste de Tukey. Os dados de migração não apresentaram distribuição normal e foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney.

3. Resultados

3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A curcumina, seus sete análogos e o controle CHX foram testados quanto à sua ação antibacteriana por meio de ensaios de CIM e CBM para as espécies bacterianas, conforme descrito no item 2.4. Destes, o composto PCR-3 OH foi o único que apresentou efeito bactericida para todas as cepas bacterianas deste estudo. O controle CHX apresentou efeito bactericida para todas as bactérias, com CIM/CBM variando entre 0,0006 e 0,005 mg/mL.

A **Tabela 1** mostra os valores de CIM e CBM obtidos para a curcumina e seu análogo PCR-3 OH contra as espécies bacterianas selecionadas. Os demais compostos não apresentaram efeito bactericida contra as espécies avaliadas e não foram incluídos na tabela. Tanto a curcumina quanto o seu análogo PCR-3 OH apresentaram valores de CIM/CBM variando entre 0,019 e 0,625 mg/mL, na presença ou ausência do LED. Contudo, PCR-3 OH teve melhor efeito inibitório/bactericida para todas as espécies, com valores de CIM/CBM menores que a curcumina. Após a irradiação com LED, os valores de CIM de PCR-3 OH foram reduzidos para todas as espécies, exceto para *F. nucleatum*. Para os valores de CBM, PCR-3 OH teve melhor efeito quando irradiado com LED contra *S. mutans*, *L. casei* e *A. israelii*. Os melhores efeitos antibacterianos do composto PCR-3 OH foram observados contra *E. faecalis*, *S. mutans* e *A. israelii*.

3.2. Ação dos compostos sobre biofilme simples

As **Figuras 3A-E** mostram o efeito da curcumina e PCR-3 OH sobre a viabilidade do biofilme inicial (72h) de todas as espécies testadas (*S. mutans*, *E. faecalis*, *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*). Ambos os compostos reduziram o crescimento dos biofilmes, quando comparados ao controle (meio de cultura sem antimicrobianos), independente da presença do LED. Quando irradiados, melhor efeito de ambos os compostos foi observado contra *E. faecalis* (redução de 2,6 a 3,1 log₁₀) e *F. nucleatum* (redução de 1-1,1 log₁₀), com diferença estatística quando comparados com os mesmos compostos não irradiados (p<0,05). Já para o biofilme maduro (1 semana), representado nas **Figuras 4A-E**, novamente ambos os compostos, na presença ou não de LED, reduziram estatisticamente o crescimento bacteriano, quando comparados ao controle. O

biofilme de *A. israelii* foi completamente eliminado na presença dos dois compostos, irradiados ou não por LED. Houve diferença estatística somente para PCR-3 OH quando foi exposto ao LED contra as bactérias *L. casei* e *F. nucleatum* (redução de 1,24 – 1,34 \log_{10}), quando comparado ao mesmo composto sem exposição. Independente do tipo de biofilme (inicial ou maduro), os compostos tiveram melhor efeito contra *A. israelii*, seguido por *S. mutans*. O controle CHX (0,5 mg/mL) eliminou o biofilme de todas as espécies testadas.

3.3. Ação dos compostos sobre biofilmes multiespécies

As **Figuras 5A e 5B** mostram o efeito da curcumina e PCR-3 OH sobre biofilmes multiespécies formados por 14 dias no interior dos túbulos dentinários radiculares, a partir de amostras de biofilme supra+subgengival ou de canais radiculares necrosadas, respectivamente. Na **Figura 5A**, ambos os compostos reduziram significativamente o biofilme quando comparados ao controle sem tratamento, sendo que melhor efeito foi observado para PCR-3 OH com 70,5% de células mortas comparada a curcumina com 54,1%. Houve diferença estatística comparando os compostos irradiados ou não por LED, com melhor efeito na presença do LED (76,5% de células mortas) para PCR-3 OH. A **Figura 5B** mostra que os compostos também reduziram o biofilme multiespécies obtidos a partir de amostras de canais radiculares, sendo que para ambos os compostos, o melhor resultado foi verificado na presença do LED (45,8% PCR-3 OH e 48,24% CUR de células mortas). O controle CHX teve efeito similar à curcumina. As **Figura 6 e Figura 7** mostram imagens 2-D de microscopia confocal representativas dos biofilmes multiespécies formados a partir de biofilme supra/subgengival ou de canais radiculares com polpa necrosada, respectivamente, e tratados com curcumina e PCR-3 OH (sob ação ou não do LED), além do controles CHX (0,5 mg/mL) e espécimes sem tratamento.

3.4. Efeito dos compostos sobre a viabilidade dos fibroblastos

A **Figura 8** mostra a porcentagem (média/desvios-padrão) de células viáveis da linhagem L-929 frente à exposição aos compostos curcumina e PCR-3 OH, na presença ou não do LED, por 24h. Abaixo da concentração 0,039 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar aumento da viabilidade celular na presença dos compostos, sendo que a curcumina foi

considerado citocompatível na concentração 0,039 µg/mL e PCR-3 OH na concentração 0,019 µg/mL. Houve redução significativa na viabilidade celular, quando os compostos foram irradiados com LED nas concentrações 0,039 e 0,019 µg/mL. Abaixo de 0,009 µg/mL não foram observadas diferenças estatísticas entre os compostos, independente da presença do LED.

3.5. Efeito dos compostos sobre a proliferação dos fibroblastos

A **Figura 9** mostra a contagem de células ($\times 10^5$) nos grupos após 6, 12 e 24h de exposição aos compostos. Nota-se primeiramente que não houve diferença entre o controle e os tratamentos realizados considerando cada tempo e irradiação com LED, exceto PCR-3 OH 0,004 µg/mL e CUR 0,004 µg/mL sem LED, que estimularam maior proliferação que no grupo controle. A presença do LED reduziu estatisticamente a proliferação celular, independente do composto ou concentração, inclusive o controle nas primeiras horas (6 e 12h).

3.5. Efeito dos compostos sobre a migração dos fibroblastos

A **Figura 10** apresenta a porcentagem de células em relação ao controle DMEM que migraram após 24h de exposição aos tratamentos. De forma geral, os compostos reduziram a capacidade de migração dos fibroblastos (considerando que o controle foi 100%), sendo que as concentrações mais altas de CUR (0,019 e 0,009 µg/mL) reduziram estatisticamente a migração celular quando comparadas ao composto PCR-3 OH, independente da concentração ou presença de LED. A presença do LED interferiu negativamente no efeito do PCR-3 OH, mas o mesmo não foi observado para a CUR. A **Figura 11** apresenta imagens representativas dos ensaios de migração, mostrando o efeito dos compostos sobre a capacidade de migrar para a área da “ferida”. Nota-se que PCR-3 OH teve efeito melhor comparado à CUR, porém, ambos não foram superiores ao controle DMEM. O LED, nos parâmetros testados, parece interferir na migração celular, principalmente de PCR-3 OH.

4. Discussão

O tratamento endodôntico tem por princípio a eliminação das bactérias presentes nos canais radiculares por meio de um processo químico-mecânico. Por vezes, é

possível ocorrer a persistência desses microrganismos, levando à ocorrência ou à recidiva de lesões periapicais. O emprego de curcumina como medicamento em Endodontia, seja para irrigação ou curativo de demora, poderia ser uma alternativa, visto que muitos estudos têm mostrado suas múltiplas funções, como agente antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório e ainda por apresentar capacidade de induzir diferenciação e migração celular, de estimular células osteoblásticas e induzir mineralização (Yamaguchi et al., 2012; Receno et al., 2015; Wang et al., 2015). Contudo, devido à algumas limitações em suas propriedades, como a cor e a solubilidade, pequenas alterações em radicais da estrutura química da curcumina poderiam gerar análogos que contornassem essas deficiências, tivessem suas propriedades terapêuticas aumentadas, sem afetar sua capacidade como fotossensibilizante, interessante para aplicação em terapia fotodinâmica (PDT).

No presente estudo, dos 7 compostos análogos de curcumina sintetizados, PCR-3 OH foi o único composto que apresentou atividade bactericida quando testado sobre as bactérias de interesse endodôntico selecionadas. Seu efeito foi potencializado na presença do LED, variando entre as espécies bacterianas. A curcumina teve efeito bactericida para as espécies *S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*, e em algumas delas, foi independente do LED. Merigo et al. (2019) detectaram redução da suspensão de *S. mutans* em 27,7% quando tratado com curcumina a 100 µM que aumentou para 78,92-99,26% quando associado ao LED azul (405nm) de 10 a 30 J/cm². Mahdi et al. (2015) expuseram suspensões de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* a LED (440-480nm) em combinação com eritrosina, curcumina (60 µM) ou peróxido de hidrogênio por 5min e observaram efeito superior da curcumina sobre *F. nucleatum* e similar ao peróxido de hidrogênio para *P. gingivalis*, mostrando que a curcumina apresenta efeito semelhante também sobre bactérias Gram negativas. Os principais mecanismos de ação da curcumina são a inibição do acúmulo do protofilamento Z (FtsZ) que perturba a síntese de parede celular e a produção de peróxido de hidrogênio que é tóxico para as bactérias (Rai et al., 2008). Os análogos de curcumina, diacetilcurcumina e 3,3'-dihidroxicurcumina (PCR-3 OH), foram testados previamente e apresentaram efeito bactericida contra *S. aureus* (Sardi et al., 2017) e *E. faecalis*/*S. aureus*/*Bacillus subtilis* (Polaquini et al., 2019), respectivamente. Recentemente, Polaquini et al. (2019) avaliaram o mecanismo de ação da dihidroxicurcumina (ou PCR-3 OH) e notaram fraca

inibição da divisão celular e maior efeito sobre a membrana, levando a crer que esse análogo de curcumina pode levar à ruptura da membrana bacteriana.

Quando a curcumina e PCR-3 OH foram avaliados sobre biofilmes simples iniciais (72h) ou maduros (uma semana), ambos os compostos reduziram o crescimento dos biofilmes, independente da presença do LED. Entretanto, quando irradiados, o efeito dos compostos variou de acordo com a espécie bacteriana, sendo que *A. israelii* e *S. mutans* foram os mais sensíveis. A diacetilcurcumina, um derivado da curcumina sintetizado a partir da conversão dos grupos hidroxila (-OH) por grupos acetila (-OCOCH₃), causou redução significativa do biofilme (de até 63% na concentração 100x CIM) de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (Sardi et al., 2017). Biofilmes de espécies de *Candida* foram reduzidos significativamente quando tratados com curcumina em associação com LED (com tempo de pré-irradiação de 4 a 8 minutos) (Andrade et al., 2013).

No presente estudo, ambos os compostos reduziram significativamente o biofilme dos túbulos dentinários quando comparados ao controle sem tratamento, sendo que melhor efeito foi observado para PCR-3 OH eliminando mais de 70% dos microrganismos obtidos do biofilme supra/subgingival e 45,8% daqueles provenientes do biofilme de canais radiculares com polpa necrótica. Oda et al. (2019) avaliaram o efeito dos seguintes tratamentos: PDT com azul de metileno + laser diodo (PDT padrão); curcumina, LED por 5 min e curcumina 20 µM com LED (k = 450–470 nm e potência de 1200±200 mW/cm²) por 5min sobre biofilme de *E. faecalis* formados em túbulos dentinários de incisivos bovinos por meio de corante Live/Dead e microscopia confocal e notaram que uma redução significativa na viabilidade bacteriana ocorreu na seguinte ordem: somente LED (em torno de 25%) < somente curcumina (em torno de 50%) < curcumina + LED = PDT padrão (em torno de 70%). Não foram encontrados trabalhos sobre o efeito de análogos de curcumina sobre biofilmes mistos.

A citocompatibilidade do composto PCR-3 OH foi observada em concentração inferior à curcumina e a presença do LED afetou a viabilidade dos fibroblastos para ambos os compostos. Ribeiro et al. (2013) verificaram que a atividade metabólica de fibroblastos L929 foi reduzida em 68,1%, 75,1% e 80% na presença de 5, 10 e 20µM de curcumina em combinação com LED a 37,5 J/cm². Os autores observaram ruptura na membrana citoplasmática e morte celular possivelmente por necrose. Bruzel et al.

(2005) notaram que a PDT usando curcumina a 13,5 μM em combinação com LED a 6 J/cm^2 resultou em 80% de morte celular e menos de 20% de morte celular por apoptose. Pourhajibagher et al. (2016) avaliaram a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos expostos a diferentes concentrações de curcumina (3, 4, 5, 10 e 20mM) e tempos de exposição de LED (30s, 60s, 2x30s com intervalo de 1min, 5 min) e notaram que a curcumina reduziu significativamente a viabilidade das células com concentrações acima de 10 mM e quando expostas ao tempo de 2x30s, mostrando que baixas concentrações de curcumina e maior frequência de exposição, mesmo em menor tempo, aumentam a toxicidade da PDT com curcumina. Em estudo recente, 3,3'-dihidroxicurcumina apresentou efeito tóxico moderado sobre diferentes células humanas do fígado e pulmão, similar à curcumina (Polaquini et al., 2019).

Estudos têm mostrado a capacidade da curcumina em auxiliar no reparo e cicatrização tecidual (Sidhu et al., 1998; 1999). Animais tratados com curcumina apresentaram re-epitelização mais precoce, melhoraram a neovascularização, aumentaram o padrão de migração de células envolvidas na cicatrização de feridas como miofibroblastos, fibroblastos e macrófagos, além de apresentarem aumento no conteúdo de colágeno (Sidhu et al., 1999). No presente estudo, CUR 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e seu análogo PCR-3 OH 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estimularam maior proliferação dos fibroblastos que no grupo controle, entretanto, os demais grupos não tiveram diferença do controle. Para a migração, nenhum grupo foi superior ao controle (DMEM – 100%), somente PCR-3 OH (sem LED) se aproximou do controle (medianas entre 70,24% e 85,18%). Corroborando com nosso estudo, San Miguel et al. (2011) avaliaram a migração de fibroblastos gengivais humanos após a aplicação de combinação de agentes antioxidantes como resveratrol, ácido ferúlico, foretina e tetrahidrocurcuminóides e notaram diferença no padrão de migração celular somente entre as concentrações dos compostos, porém, nenhum grupo produziu maior migração que o controle.

De forma geral, neste estudo, a presença do LED não teve efeito benéfico sobre a proliferação e migração celular, independente do composto ou de sua concentração. De maneira similar, Mamalis et al. (2015) investigaram o efeito do LED azul de 5 a 80 J/cm^2 sobre fibroblastos da pele humana e notaram que este reduziu significativamente a proliferação celular (de 8,4 a 55,5%) e a velocidade de migração (de $95 \pm 7.0\%$ a $32,3 \pm 1.9\%$) de maneira dose-dependente, em comparação ao

controle. Os mesmos autores mostraram que a irradiação com LED azul resultou em aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), de maneira também dose dependente, o que pode acarretar em danos no DNA celular. Como visto no presente estudo, Mamalis et al. (2015) também notaram uma redução na proliferação, sem necessariamente significativa redução na viabilidade celular. Essas alterações na contagem final das células pode ser resultado da modulação no ciclo celular, aumento da autofagia e/ou apoptose. É possível que a luz azul gerada pelo LED tem aspectos biologicamente relevantes similares à luz UVA, tais como a geração de ROS e efeitos imunomodulatórios, devido à proximidade da UVA e luz azul no espectro eletromagnético (Mamalis et al., 2015). Neste estudo, as concentrações testadas de curcumina e seu análogo possivelmente não mostraram efeito antioxidante suficiente para controlar ROS geradas pelo LED. Estudos futuros são necessários para avaliar outros parâmetros do LED e explorar a capacidade antioxidante dos curcuminoides de forma que possam reverter ou prevenir os efeitos negativos do LED sobre a proliferação e migração celular.

5. Conclusão

O análogo PCR-3 OH apresentou atividade bactericida e efeito sobre biofilmes simples e multiespécies de bactérias de interesse endodôntico superior ao composto original curcumina, principalmente sob ação do LED. Entretanto, sua citocompatibilidade foi inferior à da curcumina. A presença do LED afetou a viabilidade, proliferação e migração dos fibroblastos, mostrando que os parâmetros de uso para fins antimicrobianos precisam ser adequados para aplicação em células eucarióticas.

6. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (#2018/10857-0), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (#131205/2017-0) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (PROCAD #88881.068437/2014-01).

7. Referências Bibliográficas

1. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A):363-98.
2. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol.* 2008 Dec 1;76(11):1590-611.
3. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013 Feb;58(2):200-10.
4. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endo.* 2016 Apr;42(4):552-6.
5. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005 Jul;4(7):523-30.
6. Caiaffa KS, Massunari L, Danelon M, Abuna GF, Bedran TBL, Santos-Filho NA, Spolidorio DMP, Vizoto NL, Cilli EM, Duque C. KR-12-a5 is a non-cytotoxic agent with potent antimicrobial effects against oral pathogens. *Biofouling.* 2017 Nov;33(10):807-818.
7. Changtam C, Hongmanee P, Suksamrarn A. Isoxazole analogs of curcuminoids with highly potent multidrug-resistant antimycobacterial activity. *Eur J Med Chem* 2010; 45:4446–4457.
8. Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994 Mar;59(3):295-302.
9. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, Fregnani ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2015).
10. Gaudin A, Tolar M, Peters OA. Lipoxin A4 Attenuates the Inflammatory Response in Stem Cells of the Apical Papilla via ALX/FPR2. *Sci Rep.* 2018 Jun 11;8(1):8921.
11. Groundwater PW, Narlawar R, Liao VWY, Bhattacharya A, Srivastava S, Kunal K, Panda DA. Carbocyclic Curcumin Inhibits Proliferation of Gram-Positive Bacteria by Targeting FtsZ. *Biochemistry,* 2017 56(3), 514–524.

12. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 May;91(5):579-86.
13. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008 34: S51-S56.
14. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A. Stem cells in current pediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol*, 2013 58 (3): 227-38.
15. Konno H. Synthesis and evaluation of curcumin derivatives toward an inhibitor of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24(2):685-690, 2014.
16. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007 86:694–707.
17. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011 Oct;37(10):1380-5.
18. Mahdi Z, Habiboalh G, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Majid Z, Nooshin A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Laser Ther.* 2015 Mar 31;24(2):103-11.
19. Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers Surg Med.* 2015 Feb;47(2):210-5.
20. Mandrol PS, Bhat K, Prabhakar AR. An in vitro evaluation of cytotoxicity of curcumin against human dental pulp fibroblasts. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry.* 2016, 34 (3), 269-272.
21. Massunari L, Novais RZ, Oliveira MT, Valentim D, Dezan Junior E, Duque C. Antimicrobial Activity and Biocompatibility of the *Psidium cattleianum* Extracts for Endodontic Purposes. *Braz Dent J.* 2017 May-Jun;28(3):372-379.
22. Merigo E, Conti S, Ciociola T, Manfredi M, Vescovi P, Fornaini C. Antimicrobial Photodynamic Therapy Protocols on *Streptococcus mutans* with Different Combinations of Wavelengths and Photosensitizing Dyes. *Bioengineering (Basel).* 2019 May 10;6(2):2-10.
23. Mishra S, Kapoor N, Ali AM, Pardhasaradhi B V V, Kumari A, Khar A, Misra K. Differential apoptotic and redox regulatory activities of curcumin and its derivatives. *Free Radic Biol Med.* 2005 May 15;38(10):1353-60.

24. Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 May;87(5):617-27.
25. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 5th ed., Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, CLSI document M7-A5.
26. Neelakantan P, Cheng CQ, Ravichandran V, Mao T, Sriraman P, Sridharan S, Subbarao C, Sharma S, Kishen A. Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance antibiofilm efficacy in root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Mar;12(1):108-14.
27. Neelakantan P, Subbarao C, Sharma S, Subbarao CV, Garcia-Godoy F, Gutmann JL. Effectiveness of curcumin against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Acta Odontol Scand.* 2013 Nov;71(6):1453-7.
28. Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan LA. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Can J Microbiol.* 2011;57(3): 204–210
29. Oda DF, Duarte MAH, Andrade FB, Moriyama LT, Bagnato VS, de Moraes IG. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. *Int. Endod. J.* 2019 52: 1010–1019.
30. Pabon HJJ. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1964 83(4):379-386.
31. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidorio DM. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2013 Sep;10(3):313-9.
32. Polaquini CR, Morão LG, Nazaré AC, Torrezan GS, Dilarri G, Cavalca LB, Campos DL, Silva IC, Pereira JA, Scheffers DJ, Duque C, Pavan FR, Ferreira H, Regasini LO. Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. *Bioorg Chem.* 2019 Sep;90:103031.
33. Polaquini CR, Torrezan GS, Santos VR, Nazaré AC, Campos DL, Almeida LA, Silva IC, Ferreira H, Pavan FR, Duque C, Regasini LO. Antibacterial and Antitubercular Activities of Cinnamylideneacetophenones. *Molecules.* 2017 Oct 10;22(10).
34. Polaquini CR. Síntese e citotoxicidade de curcuminoides e híbridos curcumina-cinamaldeído. 2016. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP.

35. Pourhajbagher M, Chiniforush N, Parker S, Shahabi, S, Ghorbanzadeh R, Kharazifard MJ, & Bahador A. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green and curcumin on human gingival fibroblast cells: An in vitro photocytotoxicity investigation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2016 15, 13–18.
36. Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity, *Biochem. J.* 2008 410:147-155.
37. Receno C, Benson M, Deruisseau K. Effects of curcumin on the expression of antioxidants in single myofibers from aged mice. *FASEB J* 2015;29(1):825-16.
38. Ribeiro APD, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, Costa CAS. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci* (2013), 28:391–398.
39. Roças IN, Siqueira JF Júnior. In vivo antimicrobial effects off endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011 Mar;37(3):304-10.
40. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):275-81.
41. San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski J, Svoboda KK. Bioactive antioxidant mixtures promote proliferation and migration on human oral fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2011 Aug;56(8):812-22
42. Sardi JCO, Polaquini CR, Freires IA, Galvão LCC, Lazarini JG, Torrezan GS, Regasini LO, Rosalen PL. Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. *J Med Microbiol.* 2017 Jun;66(6):816-824.
43. Schneider R, Rex Holland G, Chiego D, Hu JCC, Nör JE, & Botero T (2014). White Mineral Trioxide Aggregate Induces Migration and Proliferation of Stem Cells from the Apical Papilla. *Journal of Endodontics*, 40(7), 931–936.
44. Selvakumar B, Venkataraman R. Synthesis and biological evaluation of some curcumin analogs and their derivatives. *Rasayan J. Chem.* 2010; 3:260–5.
45. Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, Singh AK, Seth P, Banaudha KK, et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. *Wound Repair Regen* 1999;5(7 (Sep–Oct)):362–74.
46. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen* 1998;6(2 (Mar–Apr)):167–77.

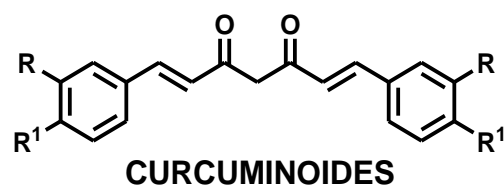
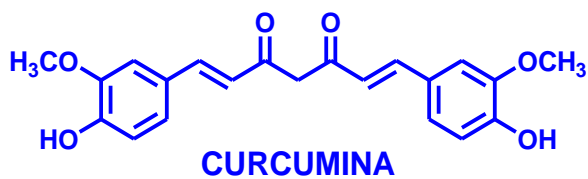
47. Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):800-5. 44.
48. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81.
49. Theodoro LH, Ferro-Alves ML, Nuernberg MAA, Ferreira RP, Andreati A, Ervolino E, Duque C, Garcia VG. Curcumin photodynamic effect in the treatment of thr induced periodontitis in rats. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(8):1783-1791.
50. Wang J, Wang H, Zhu R, Liu Q, Fei J, Wang S. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. *Biomaterials, Surrey,* 2015;53:475-483.
51. Yamaguchi M, Moore TW, Sun A, Snyder JP, Shoji M. Novel curcumin analogue UBS109 potently stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis: involvement in Smad activation and NF- κ B inhibition. *Integr. Biol.,* 2012, 4, 905–913.
52. Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, Cao Y, Haaapasalo M. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *J Endod.* 2016; 42(8):1246-50.
53. Young GR, Parashos P, Messer HH. The principles of techniques for cleaning root canals. *Aust Dent J.* 2007; 52 (1):52-63.

Tabelas

Tabela 1. Valores de CIM (CBM) (em mg/mL) para os compostos curcumina e PCR-3 OH

Bactérias	Curcumina		PCR-3 OH		CHX
	Sem LED	Com LED	Sem LED	Com LED	
<i>E. faecalis</i>	>0,625	>0,625	0,078	0,019	0,0025
	(>0,625)	(>0,625)	(0,078)	(0,019)	(0,0025)
<i>S. mutans</i>	0,625	0,625	0,078	0,019	0,0006
	(0,625)	(0,625)	(0,156)	(0,019)	(0,0012)
<i>A. israelii</i>	0,019	0,019	0,625	0,039	0,0050
	(0,039)	(0,039)	(>0,625)	(0,039)	(0,0050)
<i>L. casei</i>	0,625	0,312	0,156	0,312	0,0025
	(0,625)	(0,625)	(0,625)	(0,625)	(0,0050)
<i>F. nucleatum</i>	0,156	0,156	0,156	0,156	0,0006
	(0,312)	(0,312)	(0,156)	(0,156)	(0,0006)

Figuras



Compostos	R	R ¹	Massa Molar (g/mol)
Curcumina	OCH ₃	OH	368,38
PCR – 4 H	H	H	276,12
PCR – 3 OH	OH	H	308,10
PCR – 4 OH	H	OH	308,10
PCR – 3 OCH ₃	OCH ₃	H	336,14
PCR – 4 OCH ₃	H	OCH ₃	336,14
PCR – 3 acetil	OCOCH ₃	H	392,13
PCR – 4 acetil	H	OCOCH ₃	392,13

Figura 1. Planejamento das estruturas químicas dos análogos de curcumina.

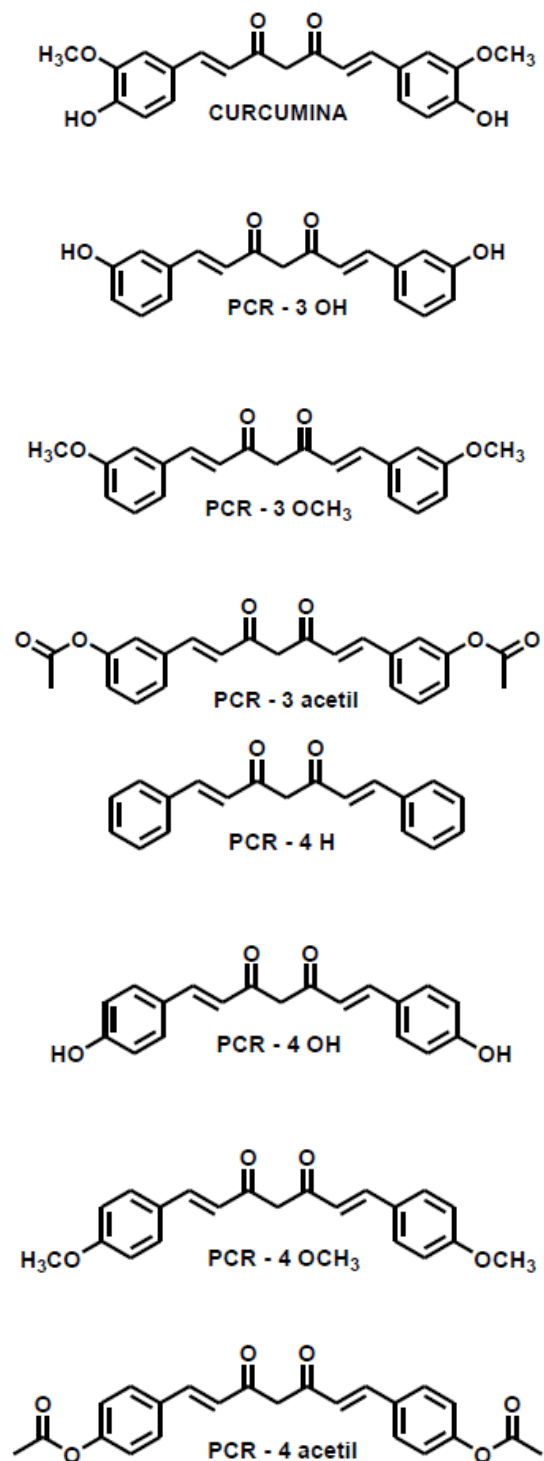


Figura 2. Estrutura química da curcumina e seus análogos.

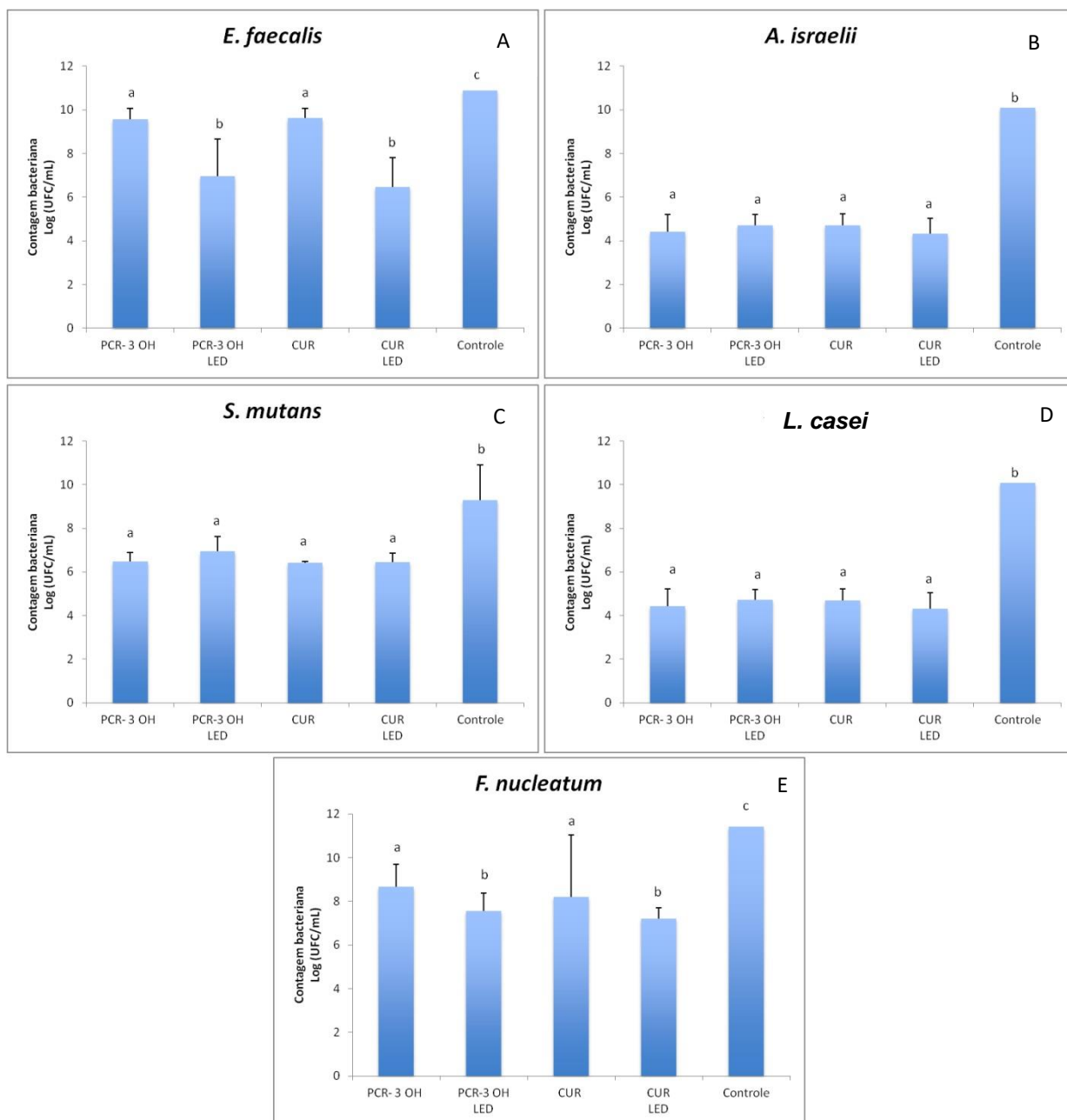


Figura 3A-E. Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina sobre biofilmes simples iniciais (72h), na presença ou não de LED. O controle foi realizado somente sem LED.

Concentração PCR-3 OH/curcumina = 0,625mg/mL.

Dados apresentados em médias/desvios-padrão.

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$)

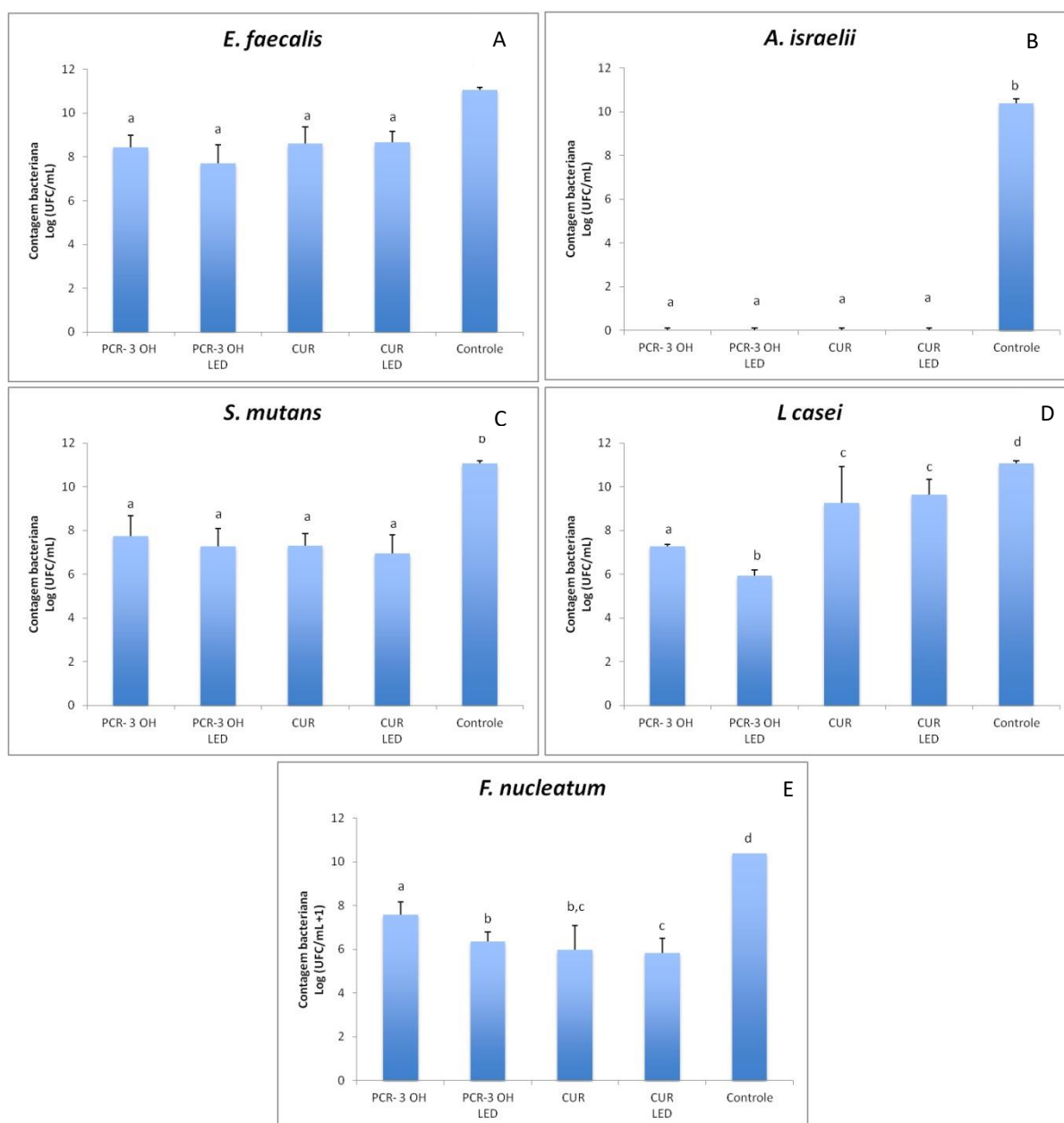


Figura 4A-E. Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina (CUR) sobre biofilmes simples maduro (1 semana), na presença ou não de LED. O controle foi realizado somente sem LED. Concentração PCR3-OH/CUR = 0,625mg/mL.

Dados apresentados em médias/desvios-padrão.

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$)

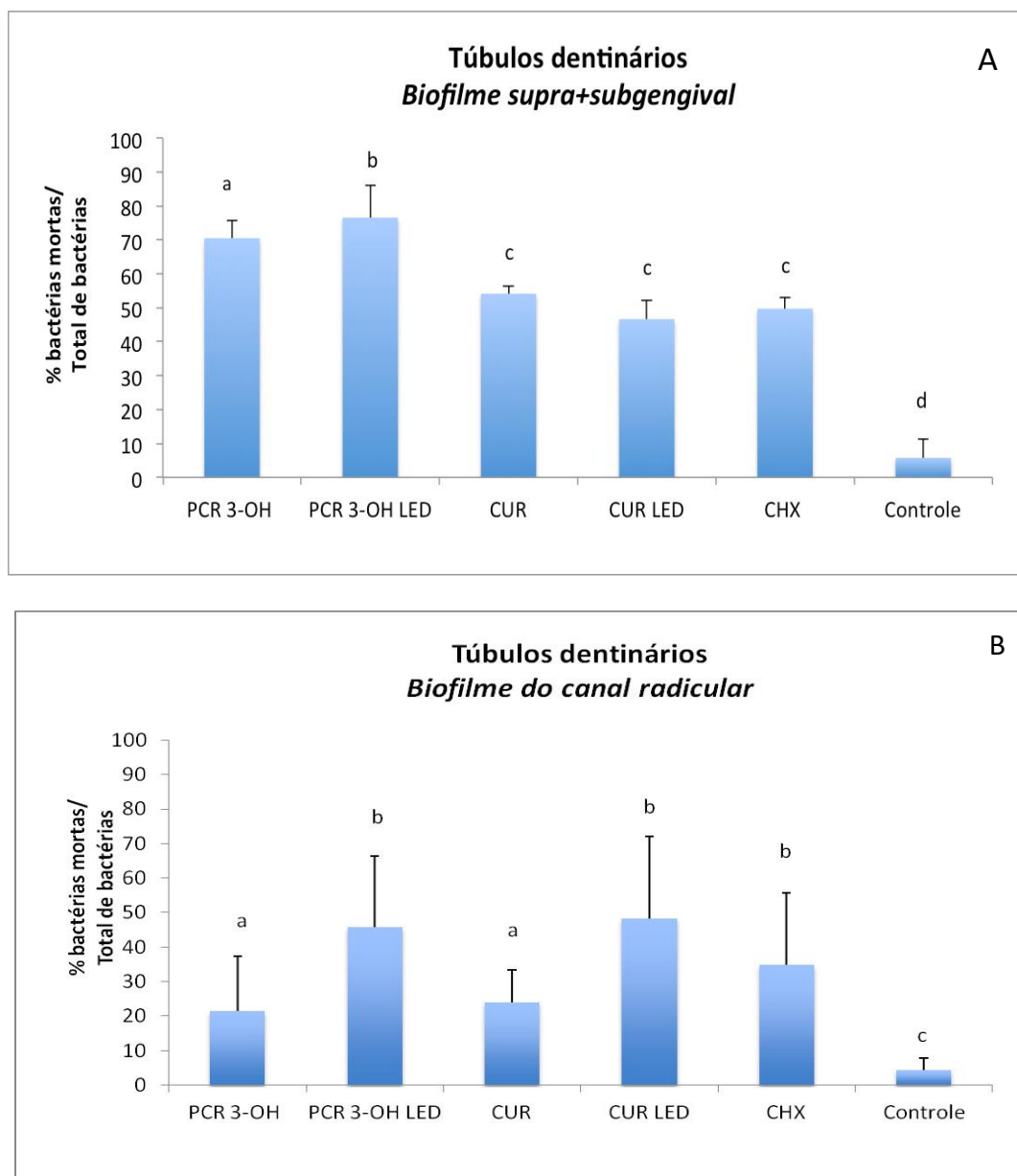


Figura 5A-B. Efeito do composto PCR-3 OH e curcumina (CUR) sobre biofilme misto (a partir de amostras de biofilme supra/subgingival humano) formado no interior dos túbulos dentinários. Concentração PCR3-OH/CUR = 0,625mg/mL.

Dados apresentados em médias/desvios-padrão.

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$)

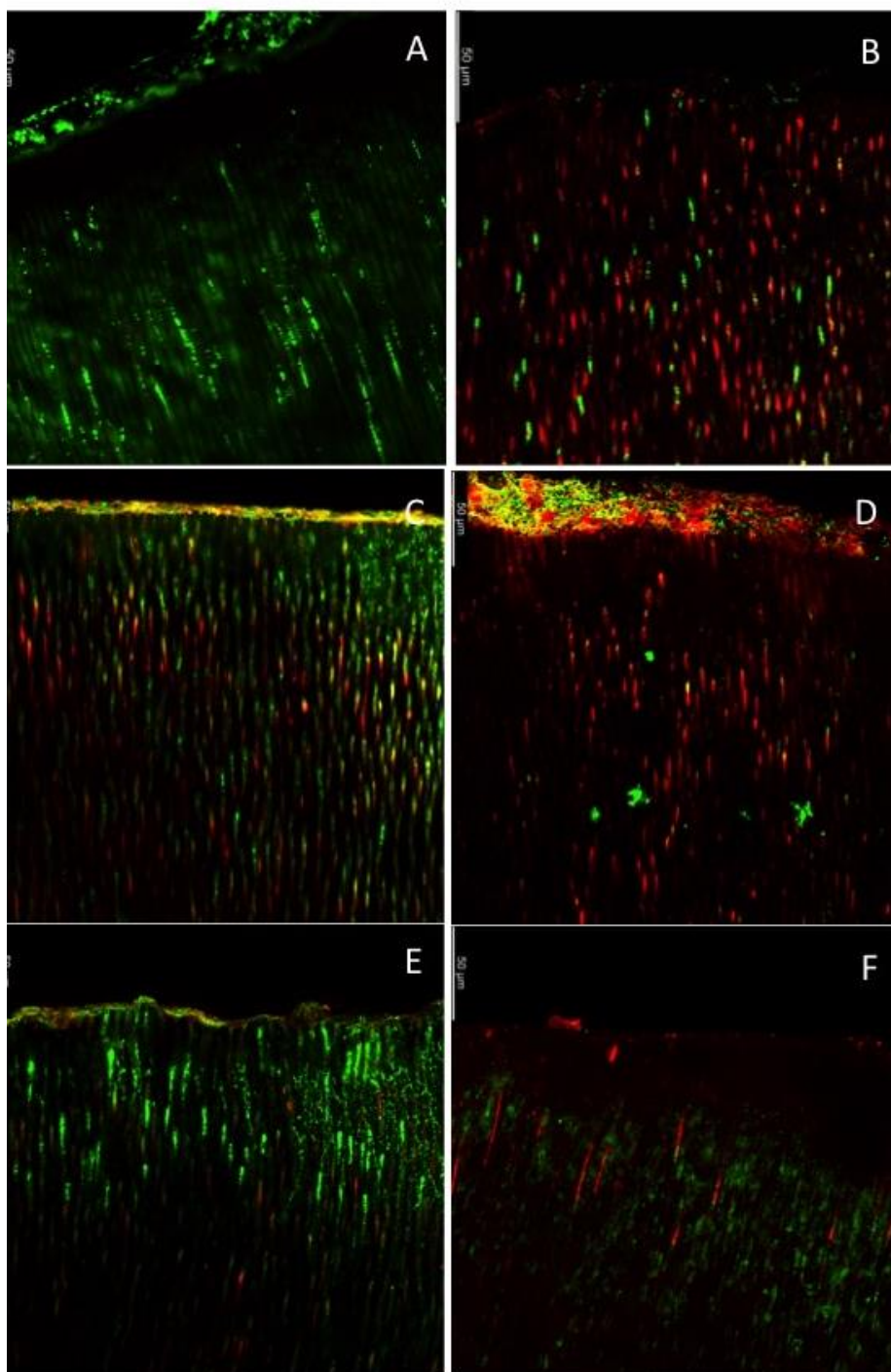


Figura 6A-F. Imagens 2-D obtidas em microscopia confocal representativas dos biofilmes multiespécies formados no interior dos canais radiculares a partir de amostras de biofilme supra e subgingival humano. A – controle; B – tratamento com CHX 0,5 mg/mL; C – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL; D – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL, sob ação do LED; E – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL; F – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL, sob ação do LED.

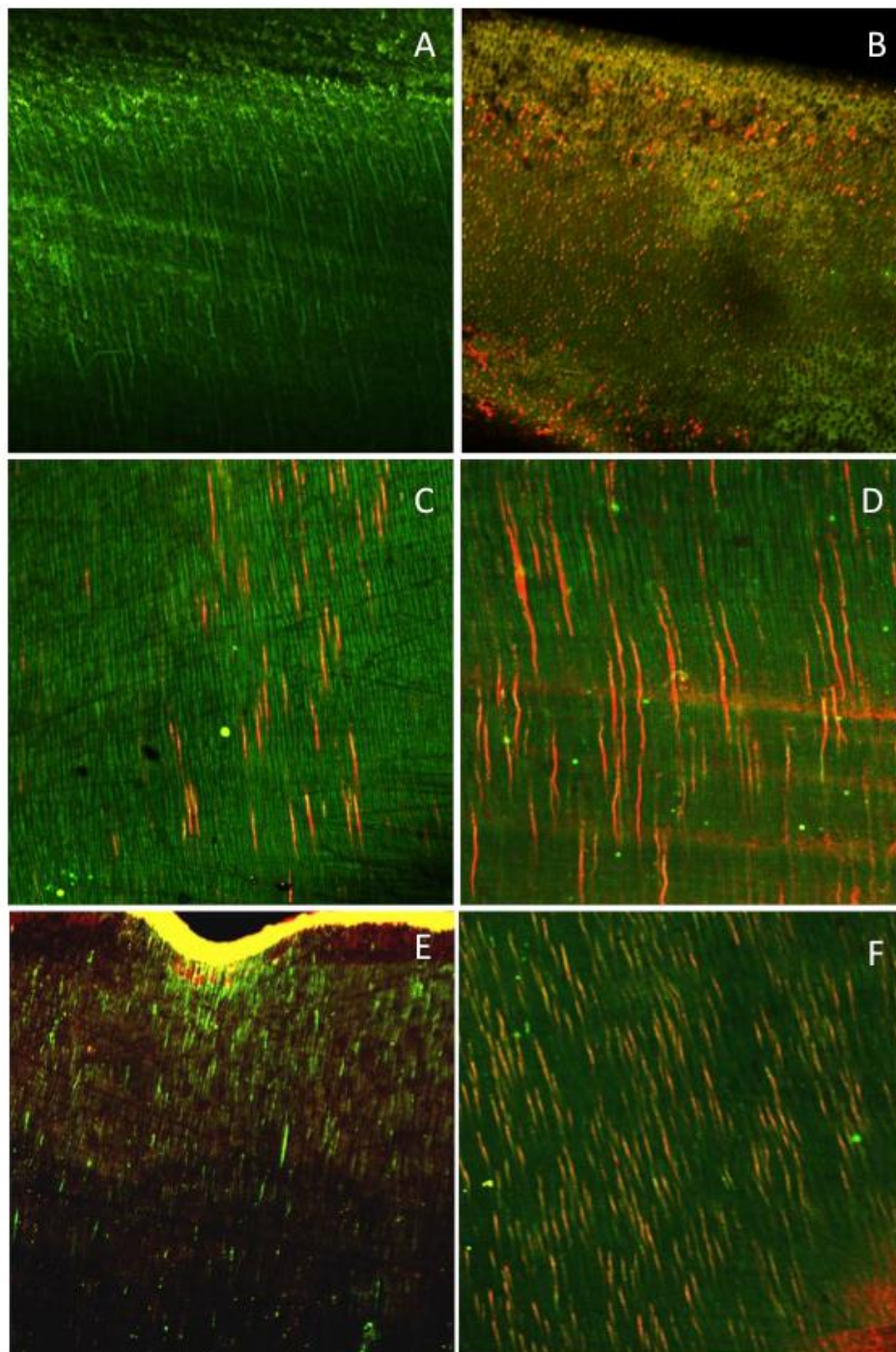


Figura 7A-F. Imagens 2-D obtidas em microscopia confocal representativas dos biofilmes formados no interior dos canais radiculares a partir de amostras de canais radiculares humanos com necrose pulpar. A – controle; B – tratamento com CHX 0,5 mg/mL; C – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL; D – Tratamento com PCR-3 OH 0,625 mg/mL, sob ação do LED; E – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL; F – Tratamento com curcumina 0,625 mg/mL, sob ação do LED.

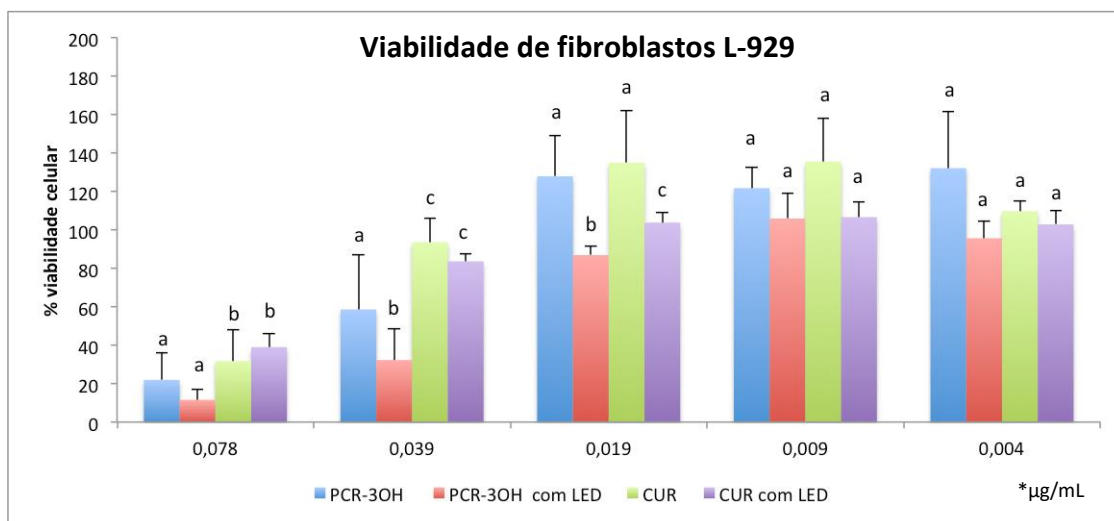


Figura 8. Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina (CUR) sobre viabilidade de fibroblastos da linhagem L-929. Dados apresentados em médias/desvios-padrão.

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada concentração separadamente, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$)

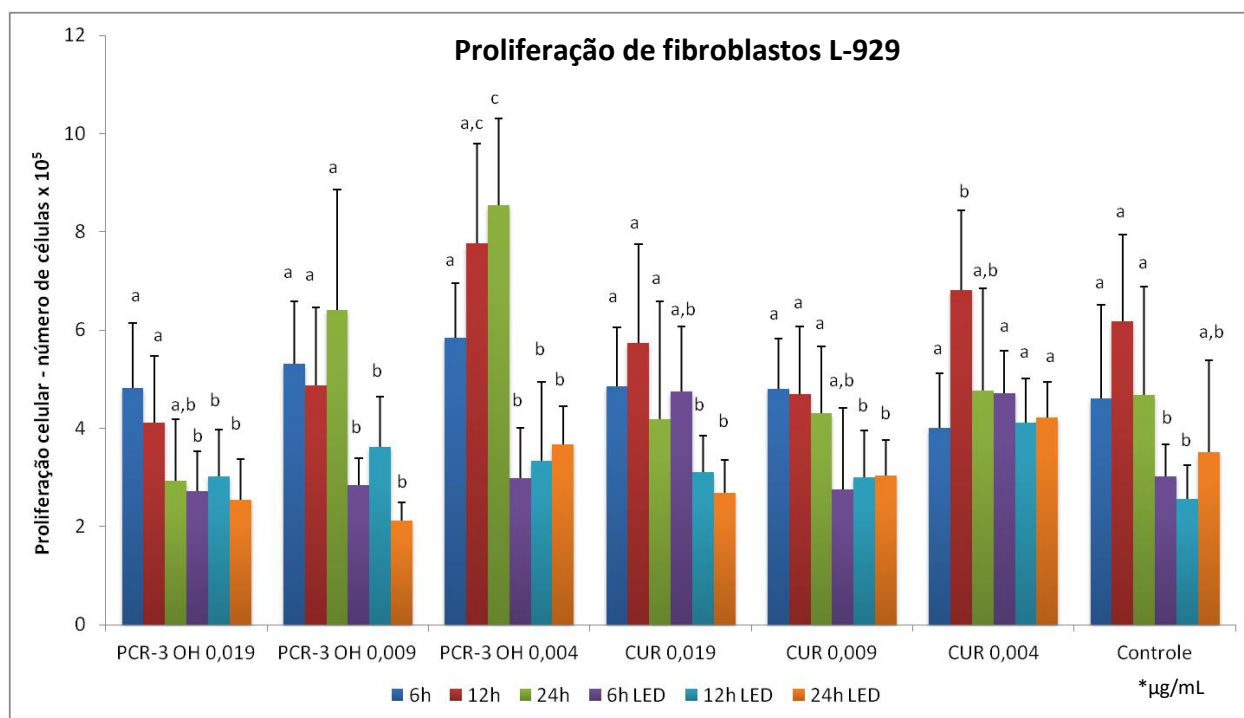


Figura 9. Efeito dos compostos PCR-3 OH e curcumina (CUR) sobre a proliferação de fibroblastos da linhagem L-929. Dados apresentados em médias/desvios-padrão. Controle=DMEM

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada concentração separadamente, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

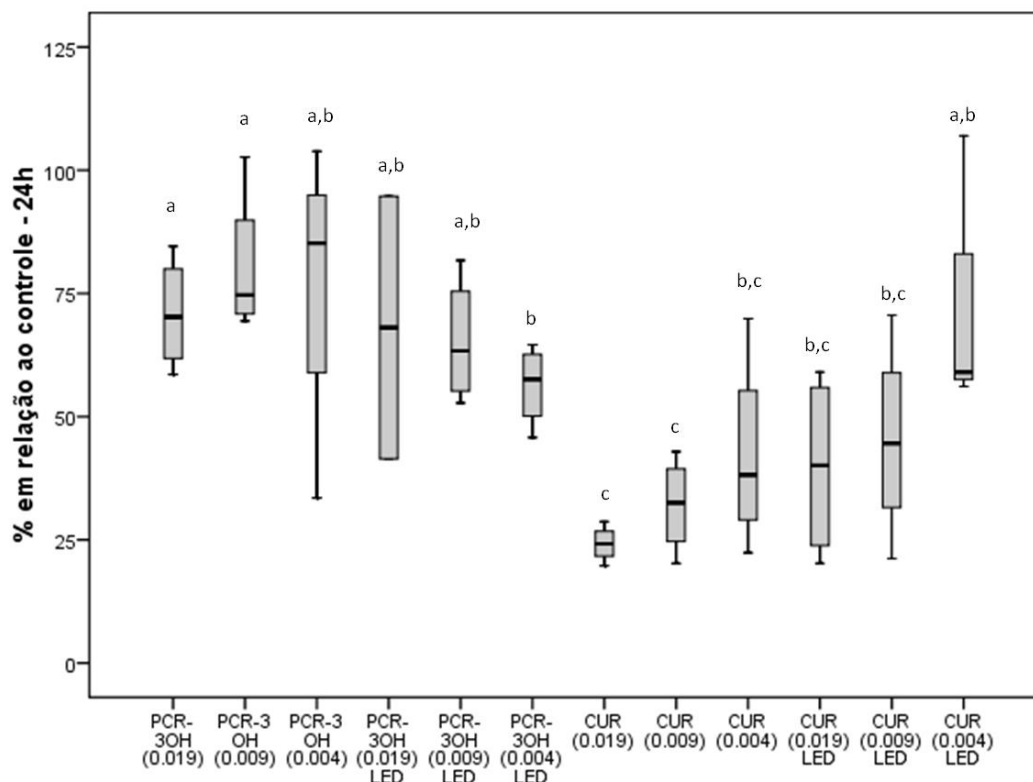


Figura 10. Box-plot representando as porcentagens de migração celular (em relação ao controle – DMEM 100%), após estímulo com os compostos PCR-3 OH e Curcumina (CUR) por 24h.

^a Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada concentração separadamente, segundo os testes de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Nota: Barras indicam valores mínimos e máximo. Caixas indicam quartis menores e maiores (25-75%). A linha do meio das caixas indica a mediana.

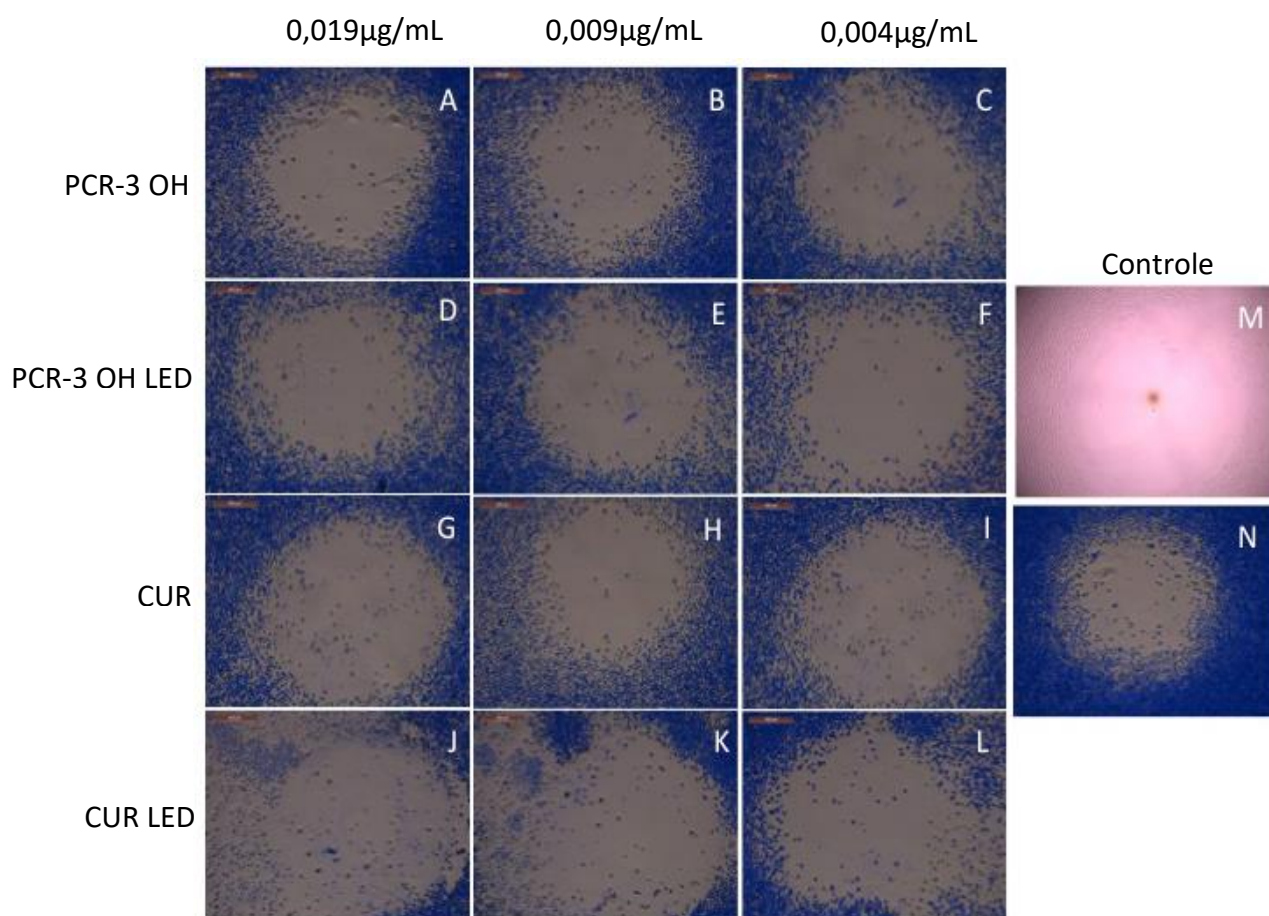


Figura 11A-N. Imagens representativas obtidas por microscopia de luz invertida e coloração com azul de Coomassie de ensaios de migração com células L-929 submetidas aos tratamentos por 24h. A: PCR-3 OH 0,019µg/mL; B: PCR-3 OH 0,009µg/mL; C: PCR-3 OH 0,004µg/mL; D: PCR-3 OH 0,019µg/mL LED; E: PCR-3 OH 0,009µg/mL LED; F: PCR-3 OH 0,004µg/mL LED; G: CUR 0,019µg/mL; H: CUR 0,009µg/mL; I: CUR 0,004µg/mL; J: CUR 0,019µg/mL LED; K: CUR 0,009µg/mL LED; L: CUR 0,004µg/mL LED; M: DMEM 0h; N: DMEM 24h.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - HUMANOS

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito antimicrobiano/antibiofilme de análogos ou híbridos de curcumina sobre microrganismos de interesse endodôntico

Pesquisador: Cristiane Duque

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 92946918.7.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.758.502

Apresentação do Projeto:

Este presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano/antibiofilme de análogos ou híbridos de curcumina sobre microrganismos de interesse endodôntico. Serão avaliados, a curcumina, uma série de compostos análogos de curcumina e uma série de híbridos de curcuminacinaldeído.

Para triagem microbiológica dos compostos será a realizada a atividade antimicrobiana pelo ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum*. Também será determinado o efeito dos compostos sobre o biofilme por meio da avaliação da atividade metabólica pelo método colorimétrico de XTT. Os ensaios serão conduzidos com biofilmes isolados, dual-espécies e misto a partir de cepas padrão de bactérias de interesse endodôntico. Em seguida, o (s) melhor (s) composto (s) será (ão) também avaliado (s) por Microscopia Confocal quanto ao efeito sobre o biofilme formado em dentina radicular bovina a partir de amostras de cepas bacterianas padrão e de amostras de biofilme supra/subgingival ou do canal radicular de dentes permanentes com necrose pulpar de 6 crianças entre 07 e 13 anos de idade. Todos os experimentos serão realizados em triplicatas e em dias independentes. Os dados serão analisados estatisticamente. No caso dos dados apresentarem distribuição normal e homogeneidade das variâncias, as variáveis poderão ser submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, caso não atendam aos pressupostos, serão submetidos aos

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.758.502

testes não paramétricos, como Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Todas as análises serão realizadas considerando nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ação antimicrobiana/antibiofilme de análogos ou híbridos de curcumina sobre microrganismos de interesse endodôntico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto oferecerá riscos mínimos aos pacientes, uma vez que esta pesquisa tem por objetivo somente coletar a placa bacteriana (supra ou subgingival) de pacientes saudáveis e coletar a placa do canal radicular de dentes sem vitalidade, antes do início do tratamento endodôntico. Essas coletas serão realizadas na clínica de Odontopediatria da FOA, sem interferir no atendimento dos pacientes e rotina da clínica. O diagnóstico, tratamento de canal e acompanhamento do caso será realizado por alunos da graduação, sob a supervisão de equipe de professores especializados da área, como rotina da atividade clínica. Assim, a participação nesta pesquisa ocasionará mínimo desconforto ao paciente, pelo uso da alça de

plástico na superfície do dente ou dos cones de papel levemente abaixo da gengiva ou no canal dos dentes (somente aqueles indicados para tratamento) para a coleta das amostras e a doação será completamente voluntária. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade

Benefícios:

Benefícios: ao participar desta pesquisa o paciente não terá nenhum benefício direto. Entretanto, pretendemos testar os compostos sobre os microrganismos que isolaremos do biofilme supra e subgingival e do canal radicular de dentes com necrose pulpar que foram coletados com o objetivo de verificar se esses compostos tem capacidade antibacteriana e assim se poderiam ser uma futura medicação para tratamento endodôntico. A pesquisadora se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Objetivos são claros e bem definidos.

A metodologia proposta é capaz de atender os objetivos do estudo.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.758.502

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não havendo pendências, recomenda-se a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a avaliação da metodologia proposta bem como dos documentos anexos somos favoráveis à execução do mesmo

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/01/2019. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1173447.pdf	04/07/2018 16:30:29		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1173447.pdf	04/07/2018 16:28:15		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1173447.pdf	04/07/2018 16:25:53		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	04/07/2018 16:22:58	Cristiane Duque	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_curcumina_analogos_hibridos.pdf	04/07/2018 03:21:42	Cristiane Duque	Aceito
Outros	Termo_de_assentimento_do_menor.docx	04/07/2018 03:16:38	Cristiane Duque	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	consentimento.pdf	04/07/2018 03:14:18	Cristiane Duque	Aceito

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.758.502

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 06 de Julho de 2018

Aldiéris Alves Pesqueira

Assinado por:

Aldiéris Alves Pesqueira
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

