

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

Araçatuba - SP
2019

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

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

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

Araçatuba - SP
2019

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237e	Santos, Vanessa Rodrigues dos. Efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico / Vanessa Rodrigues dos Santos. - Araçatuba, 2019 97 f. : il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Cristiane Duque Coorientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti 1. Curcumina 2. Cinamaldeído 3. Atividade antimicrobiana 4 Biofilmes 5. Citotoxicidade I. T. Black D27 CDD 617.645
-------	--

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Vanessa Rodrigues dos Santos

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

Comissão Examinadora

Vanessa Rodrigues dos Santos

Defesa de Dissertação

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

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

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

Epígrafe

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

Dedicatória

Vanessa Rodrigues dos Santos

À Deus,

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

Ao Senhor dedico esta conquista!

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

Jeremias 17:7

Aos meus pais,

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

Esta vitória é por vocês e para vocês!

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

dá. " Deuteronômio 5:16

Agradecimentos Especiais

Vanessa Rodrigues dos Santos

Aos meus pais, Roberto e Euciene

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

Aos meus irmãos, Victor e Renata

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

A minha orientadora, Cristiane Duque

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

A minha querida amiga Morganna

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

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

A minha querida amiga Karina

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

Aos amigos Isabela, Caio, Heitor e Igor

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

Ao Leonardo Moraes

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

Ao querido José Antônio

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

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

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

A minha coorientadora, Aimée Maria Guiotti

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

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

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

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

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

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

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

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

Resumo

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

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

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

Abstract

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

Abstract

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

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

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

Lista de Figuras

Vanessa Rodrigues dos Santos

Lista de Figuras

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

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

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

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

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

Sumário

Vanessa Rodrigues dos Santos

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

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

Autores:

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

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

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

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

** Correspondência:*

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

Telefone: 55-18-36363315.

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

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

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

Resumo

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

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

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

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

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

Introdução

Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Material e Métodos

Material e Métodos

1. Compostos químicos e controles

1.1. Obtenção dos compostos híbridos

Neste presente estudo foram sintetizados os seguintes compostos: a curcumina, o cinamaldeído e 23 compostos híbridos de curcumina-cinamaldeído e 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. Brevemente, os compostos híbridos de curcumina e cinamaldeído foram planejados em três séries. Os híbridos da série I foram obtidos pela junção da subunidade C_6C_3 da curcumina (4) com a subunidade C_2C_6 do cinamaldeído (5), culminando na obtenção de difenilpentanoides assimétricos ($C_6C_5C_6$). A série II foi planejada pela junção da subunidade C_6C_3 da curcumina com a subunidade C_6 do cinamaldeído e a série III consiste de híbridos obtidos da reunião da subunidade C_6 da curcumina com a subunidade C_3C_6 do cinamaldeído (Figura 1, cedido pelo Prof. Dr. Luis Regasini). Cada série gerou de 20-40 compostos híbridos por hidroxilações/metoxilações nos anéis A e B. Contudo, foram selecionados para o presente estudo aqueles com maior possibilidade química de apresentarem efeito biológico. Para a preparação dos híbridos curcumina-cinamaldeído das séries I–III foi utilizada a reação de condensação aldólica entre aldeídos aromáticos e acetonas aromáticas. As reações foram catalisadas com ácido sulfúrico (Katsori et al., 2011) ou hidróxido de sódio (Shailendra et al., 2007), na presença de etanol como solvente. As substâncias das séries I–III foram purificadas por diversas técnicas, testadas para cada composto: precipitação, cristalização, extração líquido-líquido e técnicas cromatográficas. O monitoramento das reações e a análise de pureza das amostras foram realizados por cromatografia em camada delgada analítica. As cromatoplasas foram reveladas por meio de inspeção no ultravioleta (254 e 365 nm) e por reagentes químicos (anisaldeído sulfúrico e iodo sublimado). A obtenção das substâncias das séries I–III foi confirmada por meio da análise de seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de 1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (RMN de ^{13}C) nos espectrômetros Bruker Avance III 9,397 (400 MHz) e 14,095 T (600 MHz), os quais fazem parte do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (Processo Fapesp 2009/53989-4).

1.2 Preparo dos compostos e controles

Os compostos híbridos, a curcumina e o cinamaldeído foram diluídos em 5% de Dimethyl Sulfoxide, (DMSO Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 30 mg/mL (solução estoque), o controle de Digluconato de clorexidina (Farmácia Manipullis –Araçatuba, SP- Brasil) em água deionizada na concentração de 20 mg/mL (solução estoque) e posteriormente filtrada em filtro Millipore 0.2 µm (Kasvi, Curitiba-PR, Brasil).

2. Cepas microbianas e condições de crescimento

2.1. Cepas padrão

Para a avaliação das atividades antimicrobiana e antibiofilme dos compostos foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Fusobacterium nucleatum* (NCTC 11326). As cepas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Os meios de culturas usados para crescimento de cada espécie bacteriana foram os seguintes: Mitis Salivarius Agar (Difco, Kansas City, MO, USA) com 0,2 U/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 5 mg/L de hemina, 5 mg/mL de menadiona, 2 g/L de extrato de levedura e 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 h e para *F. nucleatum* em condições de anaerobiose por 1 semana (jarras contendo sistema de anaerobiose AnaeroGen (Oxoid, Hampshire, UK).

3. Triagem dos compostos quanto à atividade antimicrobiana

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

Inicialmente, curvas de crescimento foram realizadas para cada microrganismo 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 MIC foram realizados 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 2.1 foram repicadas em meio caldo Miller-

Hinton (MH) (Difco) por 24 h a 37° C em condições de 5% de CO₂ ou anaerobiose, dependendo do crescimento de cada microrganismo. Quando a cultura atingiu a metade da fase logarítmica, as células foram separadas por centrifugação a 5000 x *g* por 5 min a 4° C. Estas foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato de sódio – PB (10 mM, pH. 6,8). Em seguida, o número de células foi ajustado utilizando-se MH caldo para obtenção de 10⁵ UFC/mL (Unidades Formadoras de colônias/mL). Um inóculo de 100 µL foi então incubado em 100 µL da diluição seriada dos compostos híbridos, curcumina, cinamaldeído (625 a 0,3 µg/mL) e controle de digluconato de clorexidina (20000 a 0,0023 µg/mL). Após incubação por 24 h a 37° C em condições de 5% de CO₂ e anaerobiose para *F. nucleatum*, foi adicionada uma solução de resazurina (Sigma) a 5 µg/mL por 3 h. Suspensões bacterianas foram incubadas com CHX ou sem nenhum agente antimicrobiano, como controles positivo e negativo, respectivamente. 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 diluídos seriadamente e plaqueados em MH ágar e incubados a 37° C em condições de 5% de CO₂ ou anaerobiose por 48 h. As colônias foram contadas com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA) e determinado o número de UFC/mL. A CBM foi considerada quando o composto ou clorexidina eliminou mais de 99% das bactérias.

4. Avaliação da citotoxicidade dos compostos sobre fibroblastos

4.1. Análise do metabolismo celular (Ensaio de MTT)

O metabolismo celular foi avaliado para os compostos em concentrações decrescentes (156 a 0,31 µg/mL) utilizando o ensaio de methyltetrazolium (MTT) sobre células semelhantes a fibroblastos da linhagem L-929, em conformidade com Soares et al. (2014). Este método permite determinar a atividade da succinatodesidrogenase - enzima SDH - representando a respiração celular (mitocondrial) e considerando como a taxa metabólica de células. Após incubação das células em contato com DMEM (grupo controle) ou DMEM contendo os compostos (grupos experimentais) por 24 h, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 90 µL de DMEM e 10 µL de solução de MTT (5 mg / mL em PBS) e as células foram incubadas a 37° C durante 4 h. Após a incubação, o meio de cultura com solução MTT foi aspirado e 200 µL de solução de isopropanol acidificado

(HCl 0,04 N) foi adicionado em cada poço por 30 minutos em agitação, para dissolver o produto resultante da clivagem de cristais violeta de formazan do anel de sal MTT pela atividade da enzima SDH, produzindo uma solução violeta homogênea. A proliferação celular foi avaliada utilizando um espectrofotômetro (Synergy H1 híbrido Multi-Modo Microplate Reader - BioTek Instruments Inc, Winooski, EUA) a 570 nm de comprimento de onda.

5. Efeito dos compostos sobre biofilmes simples

5.1. Avaliação da atividade metabólica do biofilme por método colorimétrico

Os ensaios foram conduzidos de acordo com Yang et al. (2016) e Massunari et al. (2017) e com biofilmes isolados de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102) e *Fusobacterium nucleatum* (NCTC 11326). Inicialmente, as culturas bacterianas foram ajustadas a 10^6 UFC/mL. A cultura bacteriana isolada foi centrifugada a $5000 \times g$ a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado duas vezes em solução salina e ressuspensionado em BHI caldo. Microplacas de poliestireno estéril 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. 20 μL de cada cultura bacteriana foram inoculados em cada um dos poços contendo 180 μL de caldo BHI suplementado com 0,5% de sacarose (para *S. mutans*), 1% de glicose (para *E. faecalis*, *A. israelii* e *L. casei*) e BHI suplementado 1% de glicose contendo 5 mg/L de hemina, 5 mg/mL de menadiona e 2 g/L de extrato de levedura (*F. nucleatum*). As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Somente para *F. nucleatum*, as placas foram incubadas em sistema de anaerobiose. As culturas foram incubadas por 1 semana e 2 semanas, sendo que o meio de cultura foi trocado a cada 48 h para as culturas em estufa de CO_2 e 1 vez por semana para *F. nucleatum*. Após esses períodos, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina estéril (NaCl a 0,9%) para subsequente adição de 100 μL dos compostos (LA11 e CHX – 10x CBM mais alto) em cada poço. Digluconato de clorexidina (10x CBM) foi considerada como controle positivo, bem como biofilme em meio de

cultura sem agentes antimicrobianos. As microplacas contendo ou não os agentes antimicrobianos foram incubadas durante 24 h, a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂. A atividade metabólica das células foi determinada utilizando o ensaio de XTT [2, 3-bis (2-methyloxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] de acordo com Chaieb et al. (2011) em que ocorre a redução do sal de tetrazólio pelas células metabolicamente ativas em um derivado de formazan solúvel em água que pode ser quantificado colorimetricamente. A solução de XTT (Sigma-Aldrich, Switzerland) a 1 mg/mL foi preparada em PBS, filtrada e estocada a -80° C. Phenazine Methosulfate (Sigma) também foi preparado em PBS e filtrada antes do uso. Após esse período de incubação, as soluções foram aspiradas e os poços, lavados com salina (NaCl 0.9%). Então, foram adicionados 200 µL de solução de XTT-Metassulfato (1:1 v/v) em cada poço pré-tratado e controles. As placas foram incubadas por 3 h no escuro a 37° C. Após isso, 100 µL das soluções foram transferidas para outra placa e a leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm para determinação da densidade óptica (DO). Os valores de DO dos controles (crescimento em meio de cultura sem antimicrobianos) foram então subtraídos dos valores de DO dos poços testes para eliminar a interferência do background.

5.2. Avaliação da viabilidade do biofilme por contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Paralelamente, seguindo a mesma metodologia e cepas bacterianas propostas do item 5.1, após 24 h de incubação com os compostos (10x CBM mais alto), alíquotas de todos os poços foram diluídas seriadamente em solução salina (10⁻⁷) e plaqueadas em BHI ágar. As placas foram incubadas durante 24 h para posterior contagem das UFC/mL, com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA).

6. Avaliação dos compostos sobre biofilme dual-espécies

Os mesmos ensaios realizados nos itens 5.1 (ensaio XTT) e 5.2. (Contagem UFC/mL) foram realizados com todas as espécies (*S. mutans*, *L. casei*, *A. israelii* e *F. nucleatum*) combinadas em biofilmes dual-espécies com *E. faecalis* como proposto por Gao et al. (2016). Após 48 h de incubação com os compostos (10x CBM mais alto), alíquotas dos poços foram plaqueadas em BHI ágar (para contagem das bactérias totais) e as placas

incubadas durante 24 h para posterior contagem das UFC/mL. Paralelamente, as alíquotas dos biofilmes dual-espécies também foram plaqueadas em BHI contendo 0,1 mg/mL (*E. faecalis* + *F. nucleatum* e *E. faecalis* + *S. mutans*), 0,5mg/mL (*E. faecalis* + *A. israelii*), 0,4 mg/mL (*E. faecalis* + *L. casei*) de cefuroxima para permitir somente o crescimento de *E. faecalis*.

7. Efeito dos compostos sobre o biofilme misto e multiespécies formado em dentina radicular e análise em Microscopia Confocal

Para este ensaio, foram realizados dois tipos de biofilme: biofilme misto com as cepas padrão utilizadas neste estudo e biofilme multiespécies com amostras clínicas.

7.1. Amostras clínicas

Amostras de placa supragengival e subgengival foram coletadas de 3 doadores adultos saudáveis entre 25-45 anos, como descrito por Yang et al. (2016), após devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FOA/UNESP (CAAE #92946918.7.0000.5420). As amostras foram inseridas em tubos contendo BHI caldo e incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂. A cultura foi centrifugada e o número de células ajustado em 10⁶ UFC/mL.

7.2. Preparo dos espécimes de dentina e contaminação bacteriana

O ensaio de biofilme para análise em Microscopia Confocal foi realizado de acordo com Ma et al. (2011). As amostras (n=6/grupo) foram preparadas a partir de raízes de incivisos bovinos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FOA (CEP 01195-2017). Esses dentes foram mantidos em solução de NaOCl 0.01% antes do uso. Um bloco de dentina radicular com comprimento de 4 mm 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. A parede do canal radicular de cada espécime foi desgastada com uma broca largo nº 6. O espécime em formato cilíndrico foi novamente seccionado em duas metades semicilíndricas com um disco de diamante de 0.6 mm (Isomet 5000; BuehlerLtd, LakeBluff, IL). A camada de *smear layer* de ambos os lados do espécime foi removida pela imersão em solução com EDTA 17% em ultrassom por 3 min e 5 min com

H₂O deionizada. Os espécimes foram esterilizados em autoclave à 121° C por 15 min. Em seguida, os espécimes foram 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 20 s.

7.3. Infecção da dentina

A infecção da dentina foi realizada com *E. faecalis* combinado em proporções iguais com as 4 espécies bacterianas padrão propostas (*S. mutans*, *L. casei*, *A. israelii* e *F. nucleatum*) (item 2.1) – biofilme misto e ainda com as amostras de biofilme humano - biofilme multiespécies (item 7.1). As culturas foram centrifugadas e o número de UFC foi ajustado em 10⁶ UFC/mL. Nos microtubos com os espécimes de dentina, foram inoculados 500 µL da cultura bacteriana com 3x10⁶ UFC/mL. Os microtubos foram centrifugados em 1400 x *g*, 2000 x *g*, 3600 x *g* e 5600 x *g* nessa sequência, duas vezes cada, por 5 min. Uma alíquota fresca de bactéria foi adicionada entre cada centrifugação e a antiga descartada. Todos os microtubos foram incubados a 37° C em BHI caldo suplementado com 1% de glicose por 2 semanas, em uma atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 h.

7.4. Desinfecção da dentina

Os espécimes de dentina foram removidos do microtubo e lavados com solução salina a 0,9% por 1 min. Os espécimes foram randomizados e divididos em grupos: LA11 (10x CBM), CHX (10x CBM, controle positivo) e solução salina (controle negativo). Cada espécime foi imerso em 350 µL de cada solução por 48 h, sob agitação inicial de 1 h. Em seguida, os espécimes foram lavados com água estéril por 1 min e posteriormente, os espécimes foram fraturados em duas novas metades para observação da superfície longitudinalmente aos canais dentinários visíveis por Microscopia Confocal.

7.5. Análise em Microscopia Confocal de Varredura a Laser

As análises em Microscopia Confocal foram realizadas na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP. As peças de dentina fraturadas foram coradas com o corante fluorescente LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability stain (Molecular Probes, Eugene, OR) contendo SYTO 9 e iodeto de propídio, 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 iodeto de propídio. 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). A espessura dos biofilmes também foi determinada após a reconstrução das imagens em 3D, como auxílio do programa Image J.

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 para metabolismo bacteriano (método de XTT) foram transformados em porcentagem (%), considerado a média do controle (sem antimicrobianos) como 100%. Os dados apresentaram distribuição normal e as diferenças entre grupos (antimicrobianos e tempos de crescimento – 1 ou 2 semanas) foi analisada por ANOVA (One-way ou Two-way) seguido pelo teste de Tukey.

Resultados

Resultados

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

A curcumina, o cinamaldeído e os 23 compostos foram testados quanto à sua ação antibacteriana por meio de ensaios de CIM e CBM, conforme descrito no item 3.1. Destes, 9 compostos da série I (nomeados de TR ou LA somente para facilitar sua identificação no laboratório) apresentaram efeito inibitório para, no mínimo, uma das espécies bacterianas testadas: *S. mutans*, *E. faecalis*, *A. israelii*, *L. casei* e/ou *F. nucleatum*. Na **Figura 2** é apresentado um esquema da reação química final utilizada para obtenção desses compostos. Nota-se que houve uma modificação na reação quando comparada àquela apresentada no planejamento inicial dos compostos.

A **Tabela 2** mostra os valores de CIM e CBM obtidos para os 9 compostos supracitados contra as espécies bacterianas selecionadas. Os demais compostos não apresentaram efeito inibitório contra nenhuma das espécies avaliadas. O composto LA11 e o controle clorexidina (CHX) apresentaram o melhor efeito inibitório para todas as espécies bacterianas testadas e, por este motivo, foram selecionados para os ensaios subsequentes. Testes de crescimento foram realizados com meio de cultura contendo DMSO a 5% (diluyente dos compostos híbridos) e não houve nenhuma interferência no crescimento das espécies testadas.

Avaliação da citotoxicidade dos compostos

A **Figura 3** mostra os resultados de citotoxicidade obtidos para o composto híbrido selecionado e o controle CHX. O IC₅₀ (concentração em que o fármaco induz até 50% de morte celular) obtido para LA11 foi de 0,052 mg/mL e para a CHX foi abaixo de 0,031 mg/mL. Houve diferença estatística entre os compostos LA11 e CHX entre 0,052 e 0,031 mg/mL, mostrando que LA11 apresentou superior citocompatibilidade quando comparado a CHX. O controle meio de cultura contendo DMSO a 5% (diluyente do LA11) não mostrou efeito tóxico sobre os fibroblastos.

Ação dos compostos sobre biofilme simples

Atividade metabólica por método colorimétrico (XTT)

As Figuras 4A-E mostram o efeito do composto híbrido LA11 e controle CHX sobre o metabolismo das bactérias (pelo método do XTT) após 1 ou 2 semanas de crescimento. Independentemente do tempo, tanto LA11 quanto a CHX inibiram completamente o biofilme de *S. mutans*. Comparando o efeito dos compostos em 1 e 2 semanas, não houve diferença estatística tanto para LA11 quanto para a CHX e nem entre eles, considerando *A. israelii* e *L. casei*. Para *E. faecalis*, ambos os compostos tiveram melhor efeito em 1 semana, reduzindo o metabolismo em 68.9% para LA11 e 72.65% para CHX. Em 2 semanas, a redução do metabolismo foi de 53.07% e 54.29% para LA11 e CHX, respectivamente. Para *F. nucleatum*, um padrão contrário pôde ser observado. Em 1 semana, houve redução de 34,7% e 45,79% do metabolismo de *F. nucleatum* após exposição a LA11 e CHX, respectivamente. Em 2 semanas, LA11 reduziu 58.11% e CHX reduziu 65% do metabolismo de *F. nucleatum*.

Viabilidade do biofilme simples por contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As Figuras 5A-E mostram o efeito do composto LA11 e do controle CHX sobre a viabilidade das espécies bacterianas pela contagem em UFC/mL. Confirmando os resultados do metabolismo bacteriano, independentemente do tempo, tanto LA11 quanto a CHX eliminaram o biofilme de *S. mutans*. Efeito semelhante foi observado para LA11 e CHX, reduzindo a viabilidade de *E. faecalis* (em 3,67 a 4 log para LA11 e 2,4 a 2,87 log para CHX) e *A. israelii* (em 1,35 a 2,23 log pra LA11 e 1 a 1,41 log para CHX), em ambos os tempos. O mesmo foi observado para *L. casei* que teve sua viabilidade reduzida em 2,41 a 3,28 log por LA11 e 2,95 log pela CHX na primeira semana. A CHX reduziu 0,49 log do biofilme de *L. casei* em 2 semanas, mas não diferiu estatisticamente do controle. Para *F. nucleatum*, tanto LA11 quanto CHX reduziram a viabilidade bacteriana (em 4 log), porém CHX não diferiu do controle em 1 semana.

Ação dos compostos sobre biofilme dual-espécies

Atividade metabólica por método colorimétrico (XTT)

As Figuras 6A-D mostram o efeito do composto híbrido LA11 e controle CHX sobre o metabolismo de biofilmes dual-espécies de todas as espécies testadas (*S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei*, e *F. nucleatum*) combinadas com *E. faecalis* após 2 semanas de crescimento. LA11 inibiu completamente e a CHX reduziu significativamente (em 58,2% para *S. mutans* e 55% para *L. casei*) o metabolismo dos biofilmes dual-espécies de *E. faecalis* com *S. mutans* ou *L. casei* quando comparados ao controle. Redução significativa da atividade metabólica (60-70%) também foi observada quando LA11 e CHX foram aplicados sobre biofilmes dual-espécies de *E. faecalis* com *A. israelii* e *F. nucleatum*, porém sem diferença estatística entre os compostos.

Viabilidade do biofilme dual-espécies por contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As Figuras 7A-D mostram o efeito do composto híbrido LA11 e controle CHX sobre a viabilidade total e de *E. faecalis* dos biofilmes dual-espécies de todas as espécies testadas (*S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei*, e *F. nucleatum*) combinadas com *E. faecalis* após 2 semanas de crescimento. Confirmando os resultados de metabolismo, LA11 eliminou completamente o biofilme dual-espécies formado por *E. faecalis* e *S. mutans* e *E. faecalis* e *L. casei*. CHX reduziu a contagem total em 5 log e de *E. faecalis* em 5,36 log para a combinação *E. faecalis* e *S. mutans* e eliminou somente *E. faecalis* no biofilme dual-espécies de *E. faecalis* + *L. casei*, embora tenha reduzido a contagem de *L. casei* em 4.87 log.

Na combinação de *E. faecalis* com *A. israelii*, LA11 e CHX apresentam efeito semelhante sobre *E. faecalis*, reduzindo em 6,47 log e 5,72 log, respectivamente. Quanto a contagem total do biofilme de *E. faecalis* e *A. israelii*, LA11 teve efeito superior a CHX, porém ambos reduziram estatisticamente as bactérias. Na combinação de *E. faecalis* com *F. nucleatum*, LA11 e CHX eliminaram completamente *E. faecalis* e reduziram significativamente *F. nucleatum*, sendo que LA11 obteve efeito superior ao controle CHX.

Ação dos compostos sobre biofilmes formados em dentina radicular bovina

Análise sobre biofilme misto formado a partir da combinação de cepas padrão

A **Figura 8** mostra o efeito do composto híbrido LA11 e controle CHX sobre a viabilidade total de biofilmes mistos formados com todas as espécies testadas (*S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei*, e *F. nucleatum* e *E. faecalis*) em proporções iguais em dentina radicular bovina. O composto híbrido LA11 teve efeito marcante sobre os biofilmes mistos, com redução de 85,93% das bactérias, porém similar à CHX que reduziu 86,45% das bactérias.

Análise sobre biofilme multiespécies formado a partir de amostras de biofilme humano

A **Figura 9** mostra o efeito do composto híbrido LA11 e controle CHX sobre a viabilidade total de biofilmes multiespécies formados a partir de amostras de biofilme supra e subgingival em dentina radicular bovina. O composto híbrido LA11 levou à redução de 33,76% dos microrganismos, efeito esse inferior ao da CHX que reduziu 86,54%.

A **Figura 10** mostra as Imagens 2-D obtidas por microscopia confocal representativas dos biofilmes mistos (A,B,C) e biofilmes multiespécies (D,E,F) formados em dentina radicular e expostos à CHX (A,D); LA11 (B, E) e controles: (C) biofilme misto e (F) biofilme multiespécies. Pode-se notar o efeito bactericida do composto LA11 e da CHX pela predominância de células mortas (em vermelho) em comparação com o controle com predominância de células vivas (em verde), para ambos os tipos de biofilmes, com redução desse efeito para o composto LA11 no biofilme multiespécies.

Discussão

Discussão

Infecções endodônticas são polimicrobianas, predominantemente de origem anaeróbia, facultativa ou estritas. Microrganismos que colonizam as regiões intrarradiculares e perirradiculares podem ser tanto comensais quanto patógenos associados com infecções orais, tais como doença periodontal e cárie dentária. A severidade dessas infecções está relacionada com a composição e fatores de virulência dessa comunidade. Entre esses fatores de virulência estão a capacidade de coagregação e formação de biofilmes e habilidade de evadir as defesas do hospedeiro (Drucker & Natsiou, 2000; Siqueira & Rôças, 2007; Mistry et al., 2011). As espécies bacterianas avaliadas neste estudo foram selecionadas por terem sido relacionadas com a infecção endodôntica primária (Rolph et al., 2001; Pourhajibagher et al., 2017; Pourhajibagher & Bahador, 2018).

Este estudo mostrou que o híbrido de curcumina e cinamaldeído LA11 apresentou citocompatibilidade e efeitos antimicrobiano e antibiofilme, rejeitando a hipótese nula proposta. Dos compostos testados, nove apresentaram efeito inibitório para, pelo menos, uma espécie bacteriana testada. Destes, a melhor ação antimicrobiana foi observada para o composto LA11 ou (2E,4E)-1-(3-hidroxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona. Os melhores efeitos foram observados contra *S. mutans*, *E. faecalis*, *L. casei* e *F. nucleatum*, com valores de CIM entre 0,009 e 0,039 µg/mL e CBM entre 0,019 e 0,039 µg/mL. Os valores de CIM e CBM mais altos do LA11 foram obtidos para *A. israelii* (CIM=CBM=0,156). Os compostos originais curcumina e cinamaldeído apresentaram CIM entre 0,156 e >0,625 e CBM entre 0,039 e >0,625. LA11 apresentou menor toxicidade sobre fibroblastos quando comparado à clorexidina. Esses resultados mostraram que a hibridização molecular gerou um composto com atividade antibacteriana 10x maior, quando comparados aos compostos originais, confirmando que essa técnica é efetiva na síntese de novos compostos antimicrobianos. Polaquini et al. (2016) avaliaram compostos derivados de cinamaldeído, obtidos pelo mesmo princípio químico (cinamaldeído + acetofenona) e observaram que os compostos 3 ((2E,4E)-1-(3-hydroxyphenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one m-OH = LA11) e 4 (2E,4E)-1-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one p-OH = LA12) obtiveram os melhores efeitos inibitórios contra as seguintes bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, com valores de

CIM/CBM entre 77,9 e 312 μM e não apresentaram efeito contra bactérias Gram-negativas. De forma diferente, no presente estudo, LA11 apresentou efeito inibitório contra *Fusobacterium nucleatum*, bactéria anaeróbia Gram-negativa, comumente isolada em infecções endodônticas. No estudo de Polaquini et al. (2016), cinamaldeído apresentou valores de CIM e CBM acima de 500 μM contra *S. aureus*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Outros trabalhos mostraram valores de CIM ainda maiores para cinamaldeído, como por exemplo 1000 mg/L (7566 μM) contra *E. coli* (Domalia et al., 2007) e 0.25 mg/mL (1891 μM) contra cepas de *S. aureus* (Ferro et al., 2016). Para curcumina, estudo mostrou valores de CIM variando de 250 a 500 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 250 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *V. cholera* (Sasidharan et al., 2014).

Neste estudo, o composto híbrido LA11 apresentou efeito significativo sobre biofilmes simples ou mistos em placas de poliestireno, de forma semelhante ou superior ao controle clorexidina, agente antimicrobiano largamente utilizado em Odontologia devido ao seu amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus (Mohammadi et al., 2014). Poucos estudos têm avaliado o efeito de agentes antimicrobianos naturais, como a curcumina e o cinamaldeído ou ainda derivados desses compostos, sobre biofilme de microrganismos associados com infecções endodônticas. Abbaszadegan et al. (2016) mostraram que óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, rico em cinamaldeído, e a pasta triantibiótica (TAP) erradicaram biofilme de *E. faecalis* após 7 e 14 dias, enquanto hidróxido de cálcio não eliminou *E. faecalis* após 14 dias (Abbaszadegan et al., 2016). Firmino et al. (2018) avaliaram a atividade antibiofilme de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* (EOCz), *Cinnamomum cassia* (EOCc) bem como o próprio cinamaldeído, em concentrações de 0,06 a 50 mg/mL, e observaram redução de até 99% da biomassa do biofilme de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Nos testes de viabilidade celular, 2 mg/mL de cinamaldeído reduziu as células bacterianas em até 5.74 log UFC/mL. A curcumina também tem sido avaliada como irrigante para terapia endodôntica, na presença ou não de fotossensibilizantes. Estudo mostrou que biofilme de *E. faecalis* foi reduzido em 83.6% na presença de curcumina 40 mM, comparando-se com 65.3% para CHX 0,2%, 81% para CHX a 2% e 92,6% para hipoclorito de sódio a 5,25% (Pourhajibagher et al., 2018). Um estudo de Li et al. (2014) avaliou biofilmes mistos de

E. faecalis com quatro cepas clínicas de *S. mutans* (C180-2, C67-1, HG723 e UA159) e observou que a presença de *E. faecalis* reduziu significativamente a contagem de células viáveis de todas as quatro cepas de *S. mutans* testadas e o nível de redução diferiu significativamente entre as cepas. Achado esse que corrobora com os nossos resultados, demonstrando que a competição microbiana pode influenciar na virulência do biofilme. Não foram encontrados estudos com derivados de curcumina ou cinamaldeído para efeito de comparação com o presente estudo.

Atualmente, estudos tem avaliado o efeito de agentes antimicrobianos para aplicação em Endodontia por meio de ensaios em dentina radicular e análise em microscopia confocal. O presente estudo mostrou que LA11 teve efeito significativo sobre biofilme radicular, reduzindo em 86% o biofilme misto obtido a partir da combinação de cepas padrão. Para o biofilme multiespécies formados a partir de amostras de biofilme sub e supragengival humano, o efeito de LA11 se reduziu para 33%, o que pode ser explicado pela complexidade da microbiota que se estabeleceu na dentina radicular. A curcumina também tem sido avaliada sobre biofilme radicular, isolada ou como agente fotossensibilizante em terapia fotodinâmica. Biofilmes de *E. faecalis* foram formados em dentes humanos instrumentados e os seguintes agentes antimicrobianos aplicados por 30 minutos: curcumina, hipoclorito de sódio e clorexidina. Curcumina erradicou os biofilmes de 2 dias e de 2 semanas, porém para biofilmes de 8 semanas, houve redução para $553 \pm 137,6$ UFC/mL, menor que do hipoclorito e maior que da CHX. Considerando os efeitos indesejáveis do hipoclorito e da clorexidina, os autores concluíram que a curcumina poderia ser um agente interessante para aplicação endodôntica (Neelakantan et al., 2013). A eficácia da curcumina ativada por LED, das pastas TAP e DAP, CHX e hidróxido de cálcio foi avaliada sobre biofilme maduro de *E. faecalis* em dentina radicular. A curcumina 2,5 mg/mL ativada por LED e a TAP reduziram estatisticamente a percentagem de células mortas nas profundidades de 200 e 400 μ m e a contagem de UFC/mL. Não foram encontrados estudos avaliando o efeito do cinamaldeído e de derivados de curcumina/cinamaldeído sobre biofilme em dentina radicular (Devaraj et al., 2016).

Embora estudos apontem os efeitos antimicrobianos e antibiofilme da curcumina e cinamaldeído, altas concentrações desses compostos (até 50 mg/mL para cinamaldeído) têm sido utilizadas para obter efeitos satisfatórios. Sendo assim, a busca por novos

compostos com efeito antimicrobiano/antibiofilme em concentrações muito menores é interessante não somente em termos financeiros, mas também, em se tratando da toxicidade que o composto poderia causar às células humanas. Neste estudo, LA11 teve menor efeito tóxico sobre os fibroblastos que a CHX, apresentado IC₅₀ de 0,052 mg/mL (abaixo dos valores de CIM/CBM para a maioria das bactérias) enquanto a CHX foi abaixo de 0,031 mg/mL. O óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, rico em cinamaldeído, provocou uma redução mínima (16%) na viabilidade de fibroblastos, quando comparado com hidróxido de cálcio (46%) e TAP (40%) (Abbaszadegan et al., 2016). No estudo de Polaquini et al., (2016), os compostos derivados de cinamaldeído com melhores efeitos antimicrobianos apresentaram moderada toxicidade sobre células pulmonares, com valores de IC₅₀ entre 46.3 to 96.7 µM. Derivados de curcumina, como os tetrahidrocurcuminoides, estimularam a proliferação de fibroblastos gengivais após 72 a 96 h, em concentrações de 10⁻⁴ e 10⁻⁵ M, mostrando que podem ter efeitos benéficos durante o reparo tecidual (San Miguel et al., 2011).

Os óleos essenciais e seus principais compostos possuem uma gama de alvos, especialmente a parede celular e a membrana citoplasmática, podendo causar efeitos como a degradação da parede celular; dano a membrana citoplasmática, aumento da permeabilidade e diminuição do ATP intracelular. O cinamaldeído pode se difundir através da matriz polissacarídica do biofilme e desestabilizá-la, favorecendo sua ação direta nas células, por meio da perturbação da membrana e as estruturas o que leva à saída de íons e a lise celular (Ranasinghe et al., 2013). A curcumina tem demonstrado interagir in vitro com FtsZ (homólogo procarionte da tubulina dos eucariotos) e inibir a formação dos protofilamentos de Ftsz em *Bacillus subtilis*, o que interfere na formação da parede celular bacteriana (Rai et al. 2008). Dentre os compostos testados neste estudo, LA11 apresentou o melhor efeito antimicrobiano. Considerando que esse composto apresenta como substituinte um grupo OH na posição *meta* e seu análogo LA12 na posição *para*, a posição do grupamento OH influenciou na atividade do composto. Além disso, compostos carregando substituintes hidrofóbicos, como F, CF₃ e NO₂ apresentaram reduzida atividade antimicrobiana, mostrando que a hidrofiliabilidade de LA11 pode ter influenciado na sua atividade (Polaquini et al., 2016). Mais estudos são necessários para confirmar o mecanismo de ação antimicrobiano de LA11.

Conclusão

O composto híbrido LA11 apresentou citocompatibilidade e efeito antimicrobiano e contra biofilme de espécies bacterianas relacionadas às infecções radiculares e poderia ser uma opção de agente antimicrobiano para aplicação no tratamento endodôntico.

Aprovação do Comitê de Ética

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).

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (outorga 2017/05892-8) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (outorga nº 131205/2017-0).

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Abbaszadegan, A., Dadolahi, S., Gholami, A., Moein, M. R., Hamedani, S., Ghasemi, Y. (2016). Antimicrobial and cytotoxic activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and triple antibiotic paste as root canal dressing materials. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 17, 105–113.
2. Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., Sung, B. (2013). Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, 169, 1672–1692.
3. Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A. C. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 23, 363-398.
4. Ali, S. M., Khan, A. A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K. S., Polasa, H., et al. (2005). Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 21, 4-20.
5. Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., et al. (2008). Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical Pharmacology*, 76, 1590-1611.
6. Banchs, F., Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol. *Journal of Endodontics*, 30, 196-200.
7. Basrani, B. R., Manek, S., Sodhi, R. N., Fillery, E., Manzur, A. (2007). Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Journal of Endodontics*, 33, 966-969.
8. Berber, V. B., Gomes, B. P., Sena, N. T., Vianna, M. E., Ferraz, C. C., Zaia, A. A., et al. (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal*, 39, 10–17.
9. Borzini, L., Condò, R., De Dominicis, P., Casaglia, A., Cerroni, L. (2016) Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. *The Open Dentistry Journal*, 19, 692-703.

10. Bose, R., Nummikoski, P., Hargreaves, K. (2009). A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *Journal of Endodontics*, 35, 1343–1349.
11. Botton, G., Pires, C. W., Cadoná, F. C., Machado, A. K., Azzolin, V. F., Cruz, I. B., et al. (2016). Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *International Endodontic Journal*, 49, 746-754.
12. Bruzell, E. M., Morisbak, E., Tønnesen, H. H. (2005). Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4, 523-530.
13. Budzyńska, A., Wieckowska-Szakiel, M., Sadowska, B., Kalemba, D., Rózalska, B. (2011) Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Polish Journal of Microbiology*, 60, 35-41.
14. Bystrom, A., Sundqvist, G. (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*, 18, 35-40.
15. Cao, Y. K., Li, H. J., Song, Z. F., Li, Y., Huai, Q. Y. (2014). Synthesis and biological evaluation of novel curcuminoid derivatives. *Molecules*, 13, 16349-16372.
16. Chaieb, K., Zmantar, T., Souiden, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2011). XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*, 50, 1-5.
17. Chignell, C. F., Bilski, P., Reszka, K. J., Motten, A. G., Sik, R. H., Dahl, T. A. (1994). Spectral and photochemical properties of curcumin. *The Journal of Photochemistry and Photobiology*, 59, 295-302.
18. CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard, 3rd ed., Wayne, PA, CLSI document, 2008, M27-A3.
19. CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed., Wayne, PA, CLSI document, 2012, M7-A9.

-
20. De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, GB., et al. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 1592-1597.
 21. Deepa, D. A., Anita, B., Sreelatha, K. T. (2010). Comparative study of the efficacy of curcumin and turmeric oil as chemoprotective agents in oral submucous fibrosis: A clinical and histopathological evaluation. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 22, 88–92.
 22. Devaraj, S., Jagannathan, N., Neelakantan, P. (2016). Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus fecalis* in vitro. *Scientific Reports*, 21, 24797.
 23. Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 69, 25-28.
 24. Ding, R. Y., Cheung, G. S., Chen, J., Yin, X. Z., Wang, Q. Q., Zhang, C. F. (2009). Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Journal of Endodontics*, 35, 745-749.
 25. Diogenes, A., Henry, M. A., Teixeira, F. B., & Hargreaves, K. M. (2013). An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics*, 28, 2–23.
 26. Diogenes, A. R., Ruparel, N. B., Teixeira, F. B., Hargreaves, K. M. (2014) Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, 40, S52-S57.
 27. Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74, 831–840.
 28. Drucker, D. B., Natsiou, I. (2000). Microbial ecology of the dental root canal. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 160-169.
 29. Estrela, C., Holland, R., Estrela, C. R., Alencar, A. H., Sousa-Neto, M. D., Pécora, J. D. (2014). Characterization of successful root canal treatment. *The Brazilian Dental Journal*, 25, 3-11.
-

-
30. Feng, L., Li, Y., Song, Z. F., Li, H. J., Huai, Q. Y. (2015). Synthesis and biological evaluation of curcuminoid derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63, 873 - 881.
31. Ferme, D., Malnersic, M., Lipoglavsek, L., Kamel, C., Avgustin, G. (2008). Effect of sodium monensin and cinnamaldehyde of the growth and phenotype characteristics of *Prevotella bryantii* and *Prevotella rumnicola*. *Folia Microbiologica*, 53, 204-208.
32. Ferro, T. A., Araujo, J. M., Pinto, B. L. S., Santos, J. S., Souza, E. B., Silva, B. L. R., et al. (2016). Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–10.
33. Firmino, D. F., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., Firmino, N. C. S., Rosa, L. D., de Carvalho, M. G. (2018). Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum Sp.* Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. *The Scientific World Journal Article*, 1-9.
34. Galler, K. M., Buchalla, W., Hiller, K. A., et al. (2015). Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *Journal of Endodontics*, 41, 363–368.
35. Gao, Y., Jiang, X., Lin, D., Chen, Y., Tong, Z. (2016). The starvation resistance and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Endodontics*, 42, 1233-1238.
36. Garcez, A. S., Arantes-Neto, J. G., Sellera, D. P., Fregnani, E. R. (2015). Effects of antimicrobial photodynamictherapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reductionand periapical lesion healing. Three years follow up, Photodiagn. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12, 575-580.
37. Giusti, J. S. M., Fontana, C. R., Guimarães, O. C. C., Pinchemel, L. C. P., & Bagnato, V. S. (2010). Single equipment combines simultaneous application of mechanical ultrasound and photodynamic action for microbial control. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, 137–138.
38. Gül, S., Savsar, A., Tayfa, Z. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes in vitro. *Cytotechnology*, 59, 113–119.
-

-
39. Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., Gao, Y. (2014). Irrigation in endodontics. *British Dental Journal*, 216, 299-303.
 40. Hancock, H. H., Sigurdsson, A., Trope, M., Moiseiwitsch, J. (2001). Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 91, 579-586.
 41. Iglesias-Linares, A., Yáñez-Vico, R. M., Sánchez-Borrego, E., Moreno-Fernández, A. M., Solano-Reina, E., & Mendoza-Mendoza, A. (2013). Stemcells in current paediatric dentistry practice. *Archives of Oral Biology*, 58, 227-238.
 42. Jacinto, R. C., Gomes, B. P., Shah, H. N., Ferraz, C. C., Zaia, A. A., & Souza-Filho, F. J. (2005). Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 777-783.
 43. Jena, A., Sahoo, S. K., Govind, S. (2015). Root canal irrigants: a review of their interactions, benefits, and limitations. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 36, 256-261.
 44. Kollanoor Johny, A., Darre, M. J., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., & Venkitanarayanan, K. (2010). Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents in vitro. *Journal of Applied Poultry Research*, 19, 237-244.
 45. Jung, I. Y., Lee, S. J., & Hargreaves, K. M. (2008). Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Journal of Endodontics*, 34, 876-887.
 46. Katsori, A. M., Chatzopoulou, M., Dimas, K., Kontogiorgis, C., Patsilinakos, A., Trangas, T., et al. (2011). Curcumin analogues as possible anti-proliferative & anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 2722-2735.
 47. Kaufman, A. Y., & Keila, S. (1989). Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 15, 224-226.
 48. Kim, K. W., Yassen, G. H., Ehrlich, Y., Spolnik, K., Platt, J. A., & Windsor, L. J. (2015). The effects of radicular dentine treated with double antibiotic paste and ethylenediaminetetraacetic acid on the attachment and proliferation of dental pulp stem cells. *Dental Traumatology*, 31, 374-379.
-

-
49. Kuruvilla, J.R., & Kamath, M.P. (1998). Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *Journal of Endodontics*, 24, 472–476.
 50. Lessa, F.C., Aranha, A. M., Nogueira, I., Giro, E. M., Hebling, J., & Costa, C. A. (2010). Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *Journal of Applied Oral Science*, 18, 50-58.
 51. Li, X., Hoogenkamp, M. A., Ling, J., Crielaard, W., & Deng, D. M. (2014). Diversity of *Streptococcus mutans* strains in bacterial interspecies interactions. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 97 –103.
 52. Ma, J., Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo M. (2011). A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Endodontics*, 37, 1380-1385.
 53. Martin, D. E., De Almeida, J. F., Henry, & M. A., et al. (2014) Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of Endodontics*, 40, 51–55.
 54. Massunari, L., Novais, R. Z., Oliveira, M. T., Valentim, D., Dezan Junior, E., Duque, C. (2017). Antimicrobial Activity and Biocompatibility of the *Psidium cattleianum* Extracts for Endodontic Purposes. *Brazilian Dental Journal*, 28, 372-379.
 55. Mishra, S., Kapoor, N., Ali, A. M., Pardhasaradhi, B. V. V., Kumari, A., & Khar, A., et al. (2005). Free Radic. Differential apoptotic and redox regulatory activities of curcumin and its derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1353-1360.
 56. Mistry, K., Sanghvi, Z., & Parmar, G. (2011). Endodontic pathogens-revisited. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 2, 14-19.
 57. Mohammadi, A., Nazari, H., Imani, S., & Amrollahi, H. (2014). Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. *Journal of Medical Mycology*, 24, 1-8.
 58. Nair P. N., Sjögren U., Figdor D., Sundqvist G. (1999). Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 87, 617-627.
 59. Neelakantan, P., Cheng, C. Q., Ravichandran, V., Mao, T., Sriraman, P., & Sridharan, S., et al. (2015). Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance

-
- antibiofilm efficacy in root canal dentin. *Photodiagnosis and Photodynamic*, 12, 108-114.
60. Neelakantan, P., Subbarao, C., Sharma, S., Subbarao, C. V., Garcia-Godoy, F., & Gutmann, J. L. (2013). Effectiveness of curcumin against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71, 1453-1457.
 61. Neelofar, K., Shreaz, S., Rimple, B., Muralidhar, S., Nikhat, M., & Khan, L. A. (2011). Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 204–221.
 62. Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of Endodontics*, 36, 16-27.
 63. Paschoal, M. A., Tonon, C. C., Spolidório, D. M. P., Bagnato, V. S., Giusti, J. S. M., & Santos-Pinto, L. (2013). Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10, 313–319.
 64. Pourhajibagher, M., & Bahador, A. (2018). An in vivo evaluation of microbial diversity before and after the photo-activated disinfection in primary endodontic infections: Traditional phenotypic and molecular approaches. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 22, 19-25.
 65. Pourhajibagher, M., Ghorbanzadeh, R., & Bahador, A. (2017). Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Brazilian Oral Research*, 18, 31, 108.
 66. Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., & Panda, D. (2008). Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal*, 410, 147–155.
 67. Ranasinghe, P., Pigera, S., Premakumara, G. A., Galappaththy, P., Constantine G. R., & Katulanda, P. (2013). Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 275.
 68. Rolph, H. J., Lennon, A., Riggio, M. P., Saunders, W. P., & MacKenzie, D., et al. (2001). Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3282–3289.
-

-
69. Sakamoto, M., Siqueira, J. F. Jr., Rôças, I. N., & Benno, Y. (2008). Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, 275-281.
 70. San Miguel, S. M., Opperman, L. A., Allen, E. P., Zielinski, J., & Svoboda, K. K. (2011). Bioactive antioxidant mixtures promote proliferation and migration on human oral fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 56, 812-822.
 71. Sasidharan, N. K., Sreekala, S. R., Jacob, J., & Nambisan, B. (2014). In Vitro Synergistic Effect of Curcumin in Combination with Third Generation Cephalosporins against Bacteria Associated with Infectious Diarrhea. *BioMed Research International*, 2014, 1-8.
 72. Selvakumar, B., & Venkataraman, R. (2010). Synthesis and biological evaluation of some curcumin analogs and their derivatives. *Rasayan Journal of Chemistry*, 3, 260-265.
 73. Serper, A., Ozbek, M., & Calt, S. (2004). Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. *Journal of Endodontics*, 30, 180-181.
 74. Shailendra, M., et al. (2007). Synthesis and characterization of some chalcone derivatives. *Trends in Applied Sciences Research*, 2, 52-56.
 75. Sheehy, E. C., & Roberts, G. J. (1997). Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Brazilian Dental Journal*, 183, 241-246.
 76. Siqueira, J. F. Jr., Guimarães-Pinto, T., & Rôças, I. N. (2007). Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *Journal of Endodontics*, 33, 800-805.
 77. Siqueira, J. F. Jr., & Rôças, I. N. (2007). Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, 18, 267-280.
 78. Siqueira, J. F. Jr., & Rôças, I. N. (2009). Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research*, 969-981.
 79. Sirtes, G., Waltimo, T., Schaetzle, M., & Zehnder, M. (2005). The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *Journal of Endodontics*, 31, 669-671.
 80. Sjogren, U., Figdor, D., Persson, S., & Sundqvist, G. (1997). Influence of infection at
-

-
- the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, 30, 297-306.
81. Soares, C. J., Santana, F. R., Silva, N. R., Pereira, J. C., & Pereira, C. A. (2007). Influence of the endodontic treatment on mechanical properties of root dentin. *Journal of Endodontics*, 33, 603–606.
 82. Stoyell, K. A., Mappus, J. L., & Gandhi, M. A. (2016). Clinical efficacy of turmeric use in gingivitis: A comprehensive review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 25, 13-17.
 83. Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., & Sjögren, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 85, 86-93.
 84. Tanase, S., Tsuchiya, H., Yao, J., Ohmoto, S., Takagi, N., & Yoshida, S. (1998). Reversed-phase ion-pair chromatographic analysis of tetracycline antibiotics. Application to discolored teeth. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 20, 279-285.
 85. Thibodeau, B., & Trope, M. (2007). Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Journal of Pediatric Dentistry*, 29, 47-50.
 86. Vianna, M. E., Conrads, G., Gomes, B. P., & Horz, H. P. (2006). Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1274-1282.
 87. Viegas-Junior, C., Danuello, A., da Silva Bolzani, V., Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. (2007). Molecular Hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1829-1852.
 88. Waghmare, P. F., Chaudhari, A. U., Karhadkar, V. M., & Jamkhande, A. S. (2011). Comparative evaluation of turmeric and chlorhexidine gluconate mouthwash in prevention of plaque formation and gingivitis: a clinical and microbiological study. *Journal of contemporary dental practice*, 12, 221-224.
 89. Wilken, R., Veena, M. S., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2011). Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 10, 12–19.
-

-
90. Wong, S. Y., Grant, I. R., Friedman, M., Elliott, C. T., & Situ, C. (2008). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. *Microbiologia Aplicada e Ambiental*, 74, 5986-5990.
 91. Yang, Y., Shen, Y., Wang, Z., Huang, X., Maezono, H., & Ma, J. (2016). Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *Journal of Endodontics*, 42, 1246-1250.
 92. Young, G. R., Parashos, P., & Messer, H. H. (2007). The principles of techniques for cleaning root canals. *Australian Dental Journal*, 52, 52-63.
 93. Zhi, C., Long, Z. Y., Manikowski, A., Comstock, J., Xu, W. C, & Brown, N. C., et al. (2006). DNA polymerase-topoisomerase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 1455-1465.

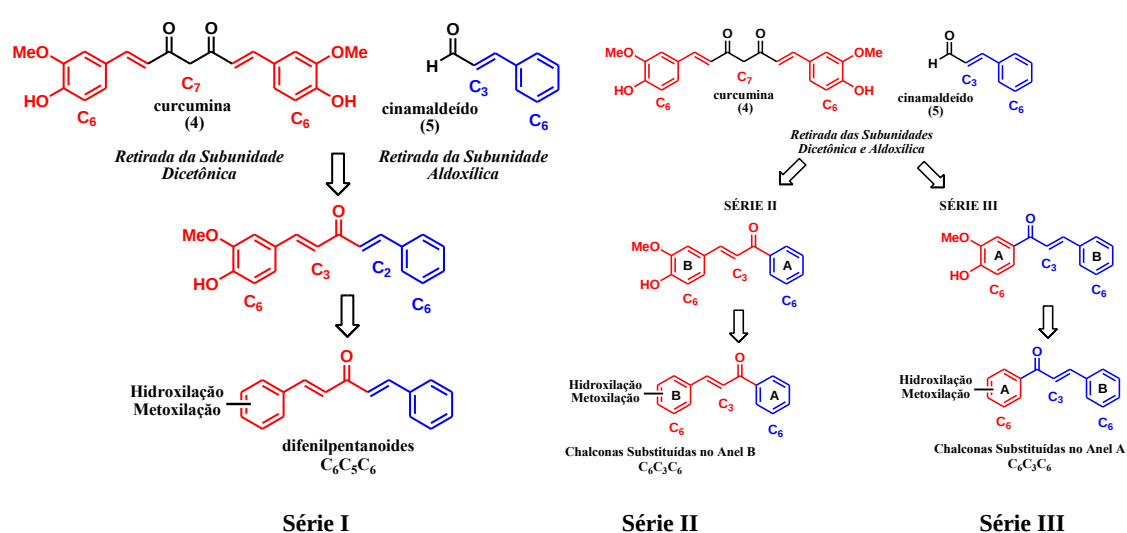


Figura 1. Planejamento dos Híbridos Curcumina-Cinamalaldeído das **Série I, II e III**

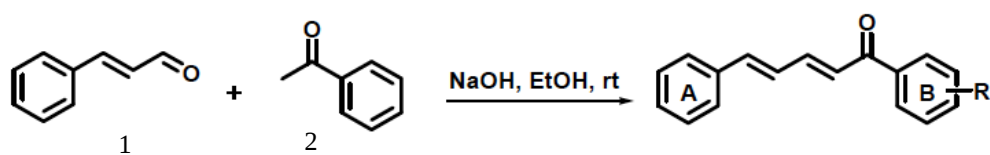


Figura 2. Esquema representando a reação química entre cinamaldeído (1) e a subunidade acetofenona da curcumina (2) que gerou os híbridos supracitados.

Tabela 1. Estrutura química dos compostos híbridos mostrando os substituintes químicos (OH, NH₃, OCH₃, CH₃ e CF₃)

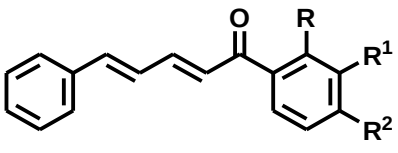
				
Código	R	R ¹	R ²	Massa molar (g/mol)
TR – 0	H	H	H	234,1
LA – 11	H	OH	H	250,1
LA – 12	H	H	OH	250,1
LA – 2	H	NH ₂	H	249,1
LA – 9	H	H	NH ₂	249,1
TR – 2	H	OCH ₃	H	264,1
TR – 5	OCH ₃	H	OCH ₃	294,1
LA – 10	H	CH ₃	H	248,1
LA – 20	H	CF ₃	H	302,1

Tabela 2. Valores de CIM e CBM (em mg/mL) para os compostos híbridos e controles

Compostos	<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>A. israelii</i>		<i>L. casei</i>		<i>F. nucleatum</i>	
	CIM	CBM	CIM	CIM	CBM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
TR0	0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625
TR2	0,312	0,156	0,625	0,312	0,625	0,625	0,312	0,625	0,312	0,625
TR5	0,625	0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625
LA2	0,078	0,078	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625
LA9	0,156	0,156	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625	> 0,625
LA10	0,156	0,156	0,312	0,312	0,625	0,156	0,312	0,625	0,039	0,078
LA11	0,019	0,039	0,019	0,039	0,039	0,156	0,039	0,039	0,009	0,019
LA12	0,039	0,078	> 0,625	0,312	> 0,625	> 0,625	0,312	> 0,625	0,625	0,625
LA20	0,625	0,625	> 0,625	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312
Cinamaldeído	0,312	0,312	0,156	> 0,625	> 0,625	0,625	> 0,625	> 0,625	0,625	0,625
Curcumina	0,039	0,078	0,625	0,625	> 0,625	0,156	0,625	> 0,625	0,625	0,625
CHX	0,0006	0,0012	0,0024	0,0024	0,0049	0,0049	0,0024	0,0049	0,0006	0,0006

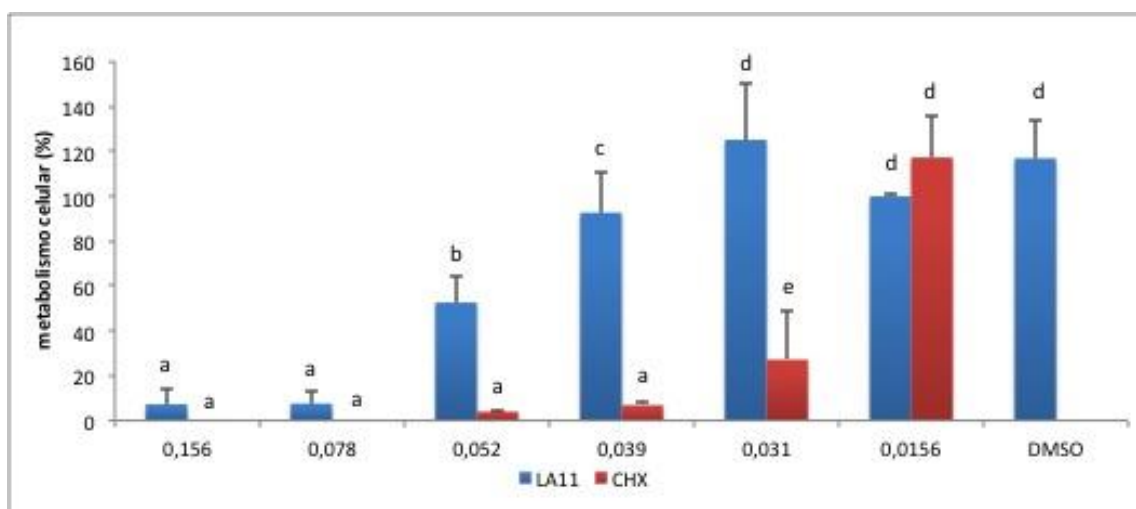


Figura 3. Média (DP) da porcentagem de metabolismo dos fibroblastos L929 expostos aos compostos LA11 e CHX.

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

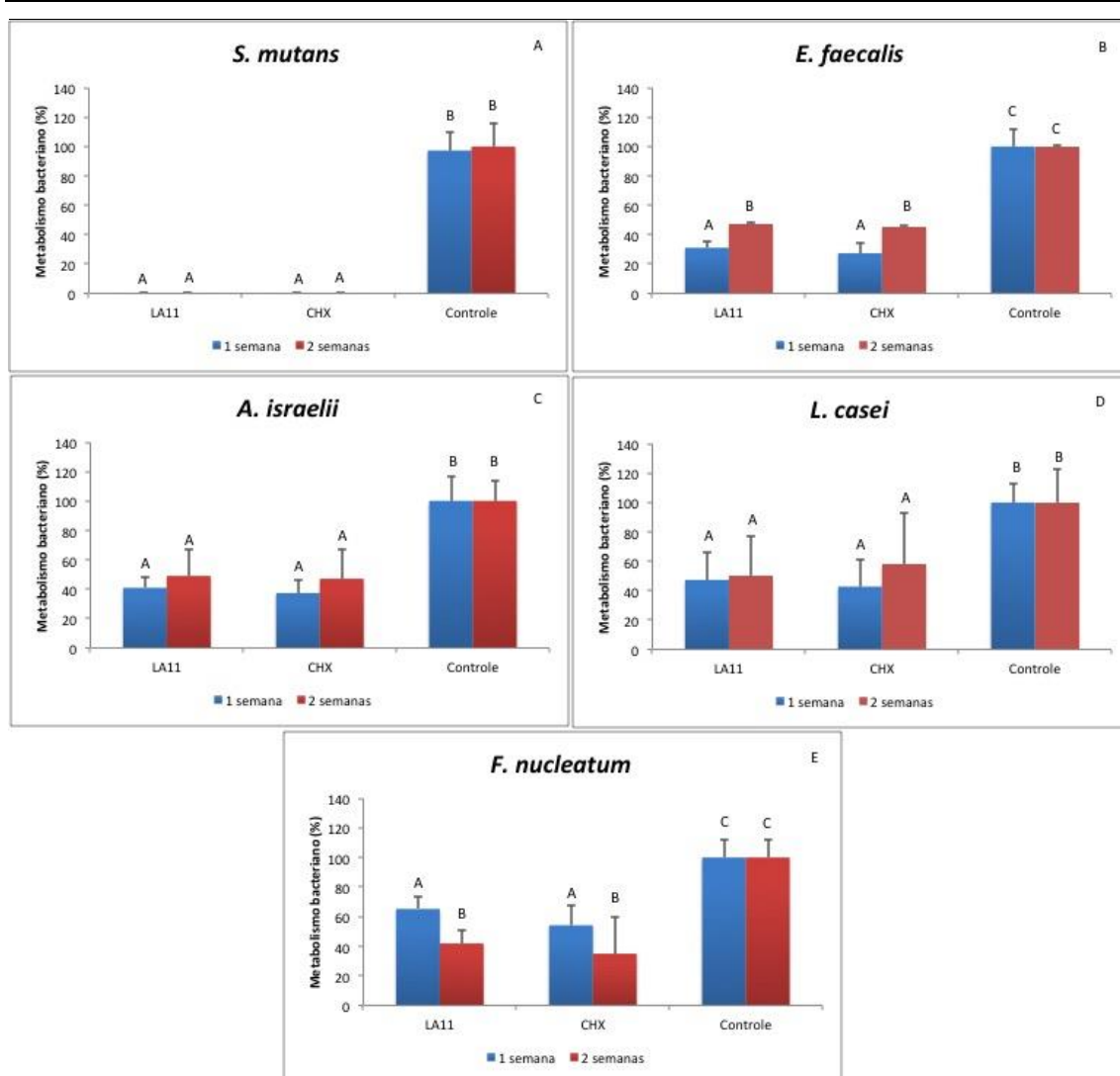


Figura 4. Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a atividade metabólica dos biofilmes simples formados por 1 semana ou 2 semanas.

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

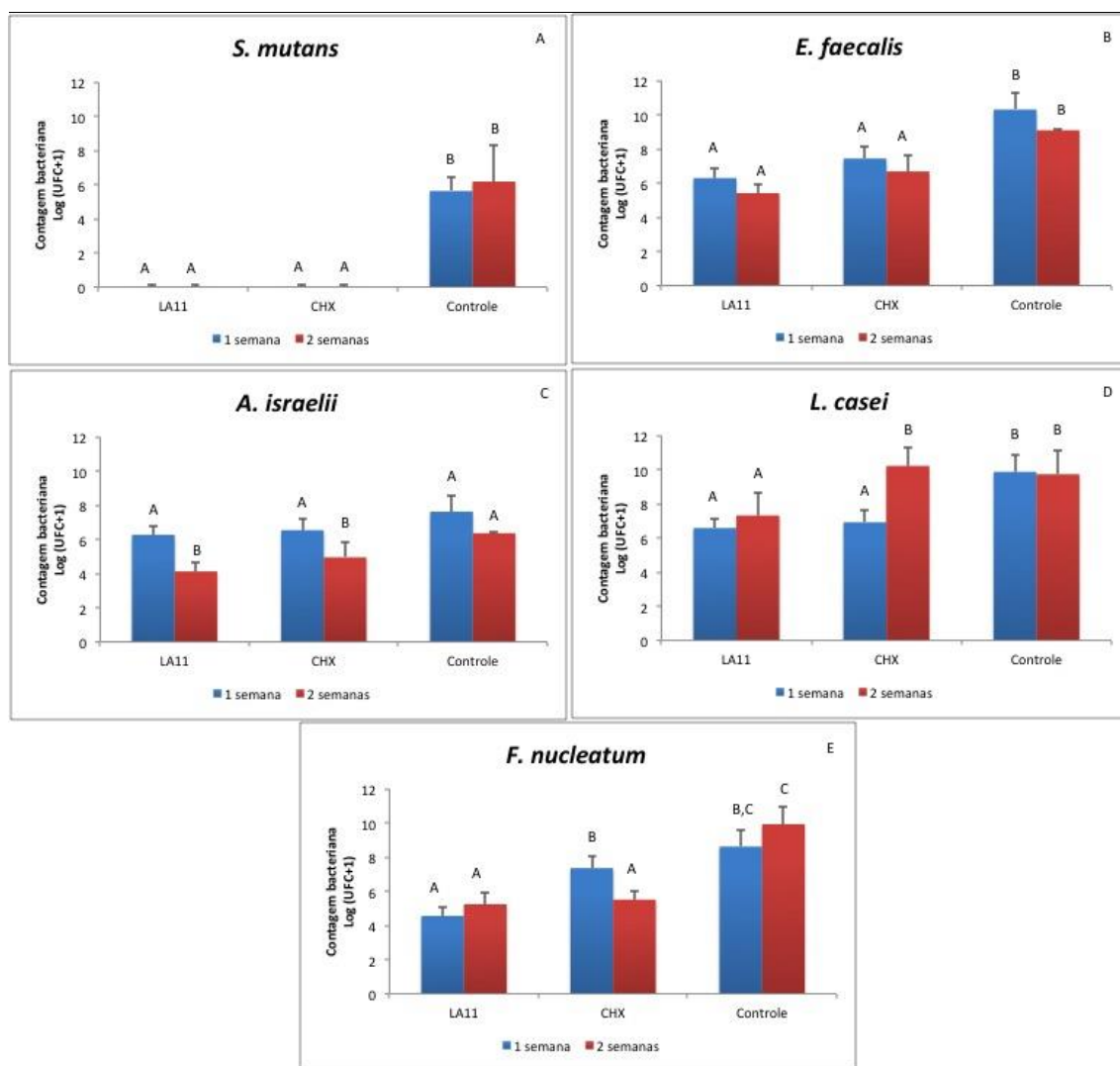


Figura 5. Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes simples formados por 1 semana ou 2 semanas.

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

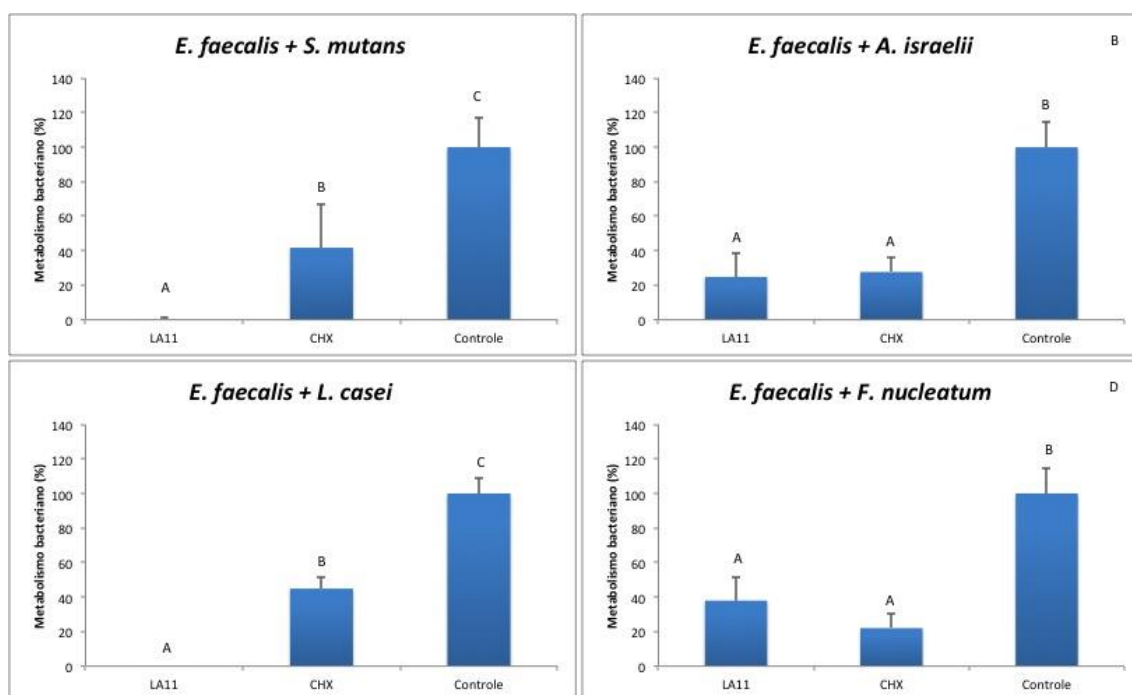


Figura 6. Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a atividade metabólica dos biofilmes dual-espécies de *E. faecalis* e as demais espécies testadas, formados por 2 semanas.

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

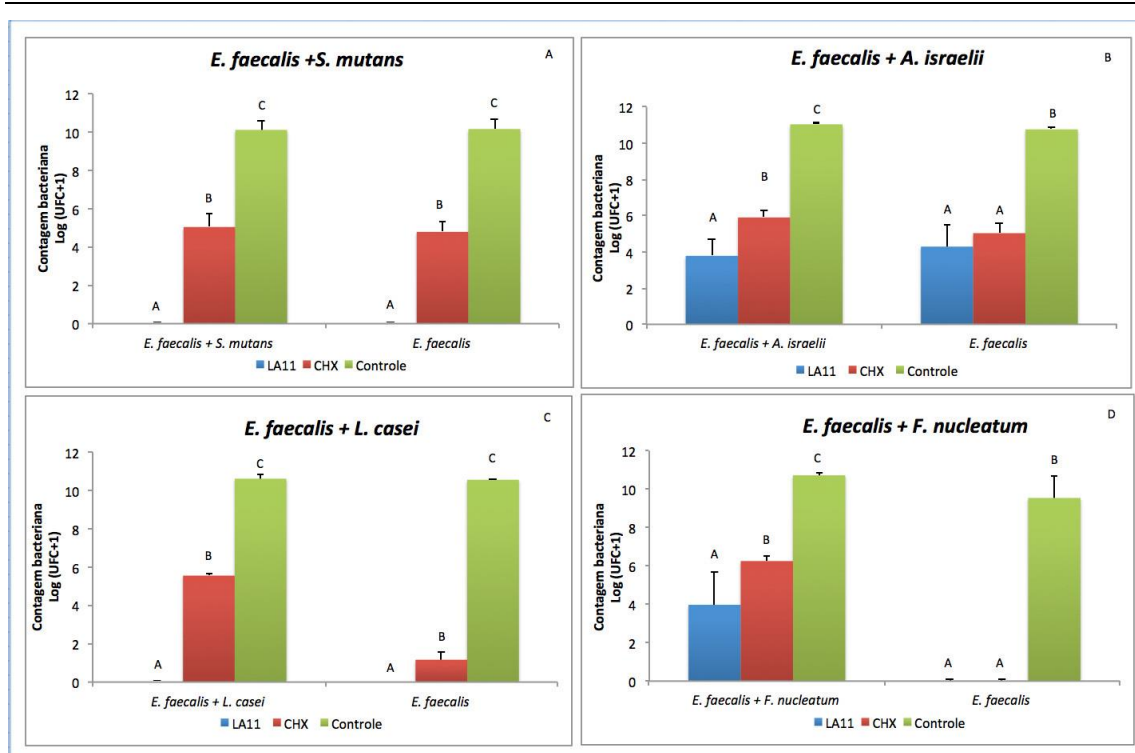


Figura 7. Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes dual-espécies de *E. faecalis* e as demais espécies testadas, formados por 2 semanas.

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

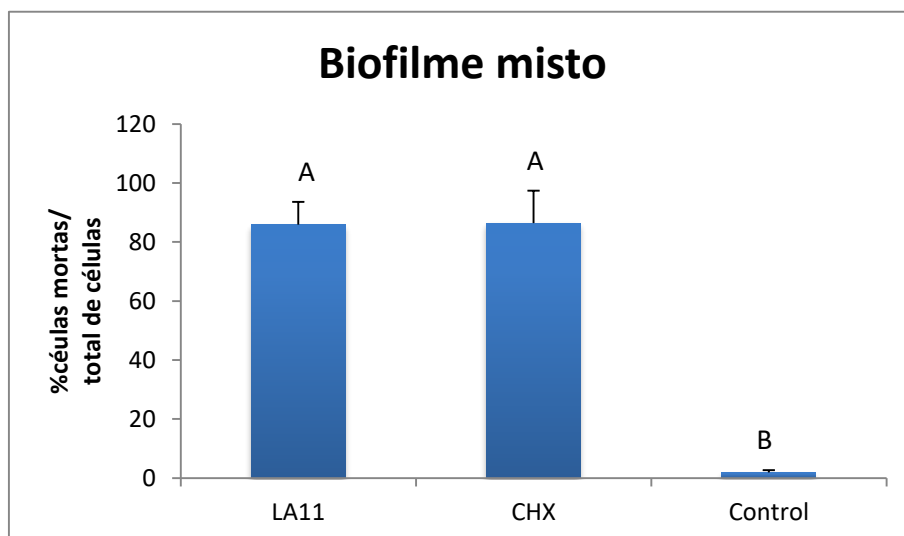


Figura 8. Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes mistos com as cepas padrão testadas, formados por 2 semanas em dentina radicular.

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

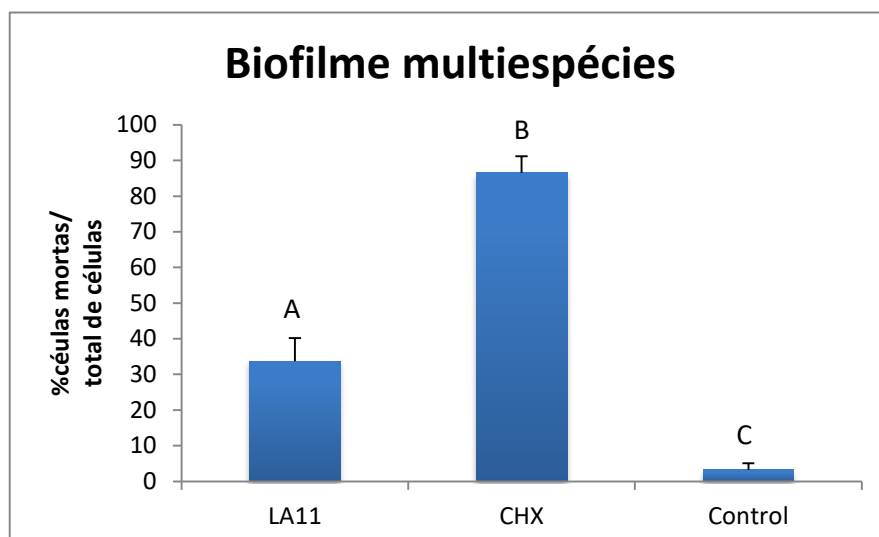


Figura 9. Efeito do composto híbrido LA11 e CHX sobre a viabilidade dos biofilmes multiespécies formados a partir de amostras de biofilmes supra e subgengival humano, formados por 2 semanas em dentina radicular.

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

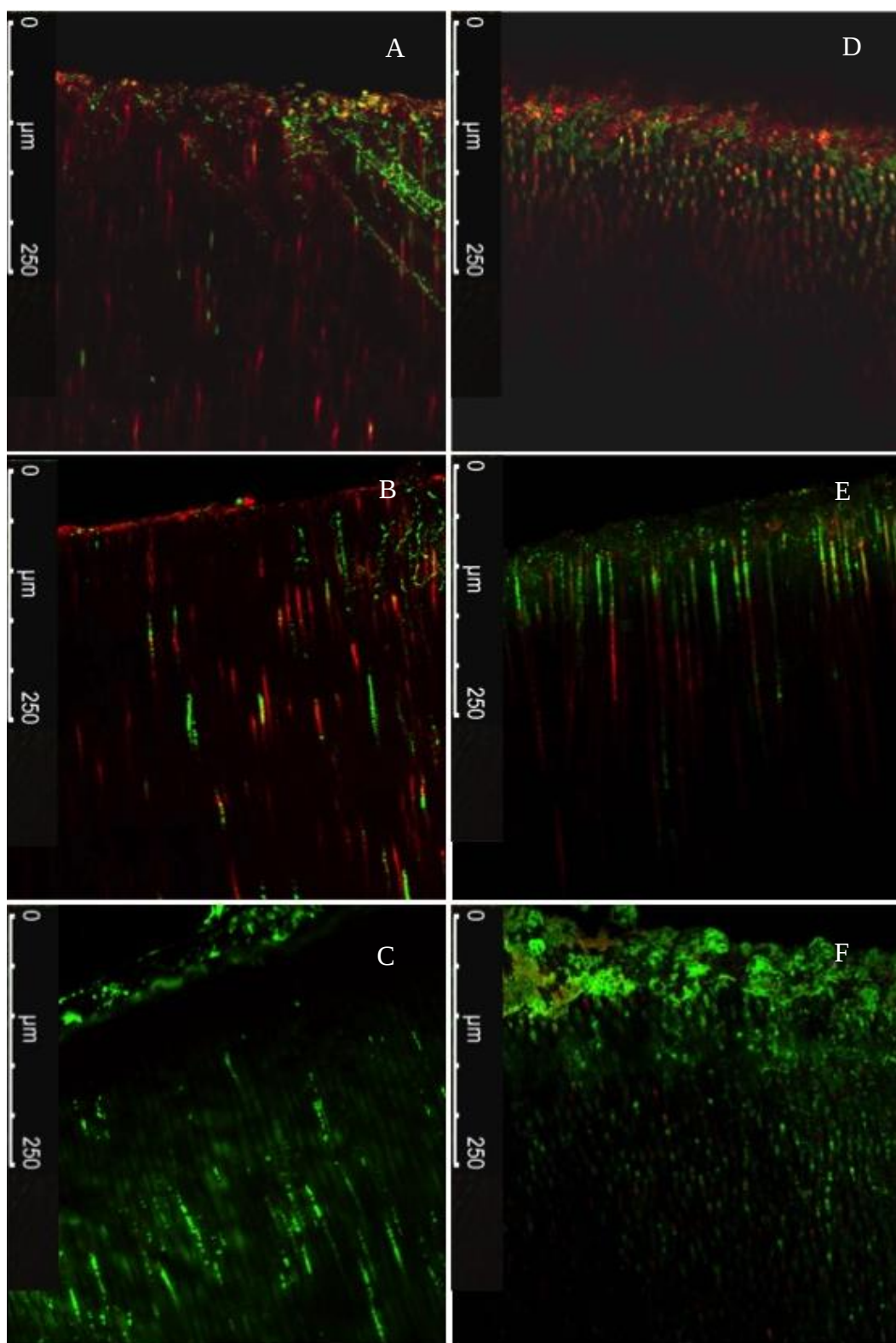


Figura 10. Imagens 2-D obtidas por microscopia confocal representativas dos biofilmes mistos (A,B,C) e biofilmes multiespécies (D,E,F) formados em dentina radicular e expostos à CHX (A,D); LA11 (B, E) e controles: (C) biofilme misto e (F) biofilme multiespécies.

Anexos

Anexo A

Protocolo de Determinação da MIC e MBC

1º dia experimental: Proceder com a reativação do microrganismo (MO) em Mitis Agar Salivarius Agar (Difco, Kansas City, MO, USA) com 0,2 U/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*, BHIA sangue para *F. nucleatum* (estriar 15 µL da cultura estoque em Técnica de esgotamento) e incubar de acordo com as exigências de ambiente requeridas para cada microrganismo e experimento.

2º dia experimental: Repicar o microrganismo da placa para o respectivo meio de cultura em caldo (5 a 10 UFC em 5mL) e incubar.

3º dia experimental: Diluição dos antimicrobianos teste:

- Diluir os compostos híbridos, a curcumina e o cinamaldeído em 5% de Dimethyl Sulfoxide, (DMSO Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 30 mg/mL.
- Pipetar 8,3 µL dos compostos híbridos, da curcumina e do cinamaldeído no primeiro poço de uma placa de 96 poços contendo 191,7 µL de Mueller-Hinton caldo.
- Ressuspender e transferir 100 µL do primeiro poço para o segundo poço ressuspender o segundo poço e transferir 100 µL para o terceiro poço, e assim sucessivamente (Técnica de diluição seriada).
- Pipetar 200 µL do controle de Clorexidina, ressuspensos na concentração inicial que se deseja (20 mg/mL) no primeiro poço de uma placa de 96 poços.
- Pipetar 100 µL de água deionizada estéril em cada poço, exceto no primeiro.
- Ressuspender o primeiro poço e transferir 100 µL para o segundo poço, ressuspender o segundo poço e transferir 100 µL para o terceiro poço, e assim sucessivamente (Técnica de diluição seriada).

* Preparar o inóculo de acordo com a curva de crescimento: D.O 0,5* Mueller-Hinton caldo para as bactérias anaeróbias facultativas e BHI caldo suplementado com Hemina e Menadiona para as bactérias anaeróbias estritas.

- Diluir 1000x no meio de cultura (500 µL do inóculo em 4,5 mL de meio).
- Pipetar 100 µL do inóculo em cada poço; tampar a placa e incubar por 24 h em condições específicas para cada microrganismo.

4º dia experimental: Pipetar 15 µL de solução de Resazurina 0,01% em cada poço e incubar por 4 h.

- Plaquear o último poço com coloração azulada (CIM) e, no mínimo, 2 poços anteriores para se determinar a CBM (Diluição de 10 para 90 µL/ 0-7 quadrantes).

5º dia experimental: Contagem das UFC/mL.

Anexo B**ENSAIO DE MTT (L929) – Análise de Viabilidade celular (24 HORAS)**

1. Realizar plantio das células (Fibroblasto L929) semeadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino em placas de 96 poços (100 μ L $\rightarrow$ 1 X 10⁴ por poço);
2. Incubar por 24 horas à 37° C com 5% CO₂ e 95% de ar;
3. Aspirar o meio;
4. Aplicar a mistura de DMEM com as concentrações dos antimicrobianos teste sobre as células, mantendo três poços para cada concentração que se quer analisar, inclusive para o controle sem antimicrobiano (meio DMEM puro);
5. Incubar por 24 h para análise da viabilidade celular.
6. Após incubação, aspirar o meio e acrescentar a 100 μ L solução de MTT (10 μ L da solução de MTT em uma concentração de 5 mg/mL em PBS 1X e 90 μ L de DMEM)
7. Incubar por 4 h;
8. Aspirar a solução de MTT;
9. Acrescentar 200 μ L em cada poço de solução de Isopropanol acidulada;
10. Agitar por 30 min;
11. Homogeneizar e transferir 100 μ L para uma nova placa de 96 poços;
12. Leitura da absorbância em 570 nm em espectrofotômetro.

ANEXO C
PROTOCOLO DO ENSAIO DE BIOFILME

1. Protocolo de Biofilme Simples formado em fundo de placa

(Concentrações dos híbridos e do controle de clorexidina são correspondentes à 10x a Concentração Bactericida Mínima)

→ Coletar uma alçada de microrganismos (5 – 10 UFC) para um tubo contendo 5 mL de BHI caldo (quando para MO anaeróbios suplementados com Hemina e Menadiona e Extrato de levedura) e incubar por 24 h em condições favoráveis de crescimento para cada MO testado.

→ Para crescimento da D.O 0.5, após 24 horas de crescimento, coletar uma alíquota de 500 µL da cultura de *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *A. israelii* e *L. casei* e acrescentar em tubos contendo 5 mL de BHI caldo com glicose 1% e de *S. mutans* em BHI caldo com sacarose a 0,5 %, incubar por 3 h e 30 min. em CO₂ a 37° C e 24 h em sistema de anaerobiose a 37° C para *F. nucleatum*.

→ Realizar uma diluição de 1000x em 4,5 mL de BHI caldo suplementado com glicose ou sacarose em concentração normal (1x concentrado).

Montagem da placa:

→ Pré-tratar uma placa de 96 poços com 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 CaCl₂, 0,16 g de KCl e 0,8 g de mucina) por 4 horas;

→ Remover a saliva e acrescentar 200 µL da cultura diluída em cada poço;

→ Incubar por 1 e 2 semanas;

→ Realizar trocas de meio de cultura fresco de 48 em 48 h;

→ Retirar o meio de cultura dos poços e lavar uma vez com 100 µL de salina 0,9%.

→ Acrescentar aos poços a concentração exata dos antimicrobianos e controles (controle positivo: clorexidina, controle negativo: BHI caldo);

→ Incubar por 24 h;

→ Após incubar, retirar a solução dos poços e lavar com 100 µL de salina 0,9%.

Para o XTT

→ Adicionar 200 µL de solução de XTT-Metassulfato (1:1 v/v) em cada poço pré-tratado e controles.

→ Incubação das placas por 3 h em agitação no escuro a 37° C.

→ Transferir 100 µL das soluções para outra placa e realizar a leitura colorimétrica em espectrofotômetro a 492 nm para determinação da densidade óptica (DO).

Para a contagem das UFC

- Remover os tratamentos e lavar com 100 µL de solução salina 0,9%;
- Adicionar 150 µL de solução salina 0,9% e ressuspender o biofilme;
- Realizar uma diluição seriada de 10 µL para 90 µL/ 0-7 quadrantes;
- Fazer plaqueamento em BHI Agar. Em cada quadrante pipetar 2 gotas de 25 µL.
- Incubar em condições favoráveis para cada MO estudado e realizar a contagem das UFC/mL.

2. Protocolo de Biofilme Dual-espécies formado em fundo de placa

(Concentrações dos híbridos e do controle de clorexidina são correspondentes à 10x a Concentração Bactericida Mínima)

- Coletar uma alçada de microrganismos (5 – 10 UFC) para um tubo contendo 5 mL de BHI caldo (quando para MO anaeróbios suplementados com Hemina e Menadiona e Extrato de levedura) e incubar por 24 h em condições favoráveis de crescimento para cada MO testado.
- Para crescimento da D.O 0.3, após 24 h de crescimento, coletar uma alíquota de 500µL da cultura de *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *A. israelii* e *L. casei* e acrescentar em tubos contendo 5 mL de BHI caldo com glicose 1% e de *S. mutans* em BHI caldo com sacarose a 0,5 %, incubar por 3 horas e 30 min. em CO₂ a 37° C e 5 h em estufa de anaerobiose a 37° C (*F. nucleatum*).
- Realizar uma diluição de 100x em 4,5 mL de BHI caldo suplementado com glicose ou sacarose em concentração normal (1x concentrado).

Montagem da placa:

- Pré-tratar uma placa de 96 poços com 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 CaCl₂, 0,16 g de KCl e 0,8 g de mucina) por 4 horas;
- Remover a saliva, acrescentar 100 µL de cada cultura diluída (volume final de 200 µL) em cada poço nas seguintes associações: *E. faecalis* + *A. israelii*, *E. faecalis* + *L. casei*, *E. faecalis* + *F. nucleatum*; *E. faecalis* + *S. mutans*
- Incubar por 2 semanas;

-
- Realizar trocas de meio de cultura fresco de 48 em 48 h;
 - Retirar o meio de cultura dos poços e lavar uma vez com 100 µL de salina 0,9%.
 - Acrescentar aos poços a concentração exata dos antimicrobianos e controles (controle positivo: clorexidina, controle negativo: BHI caldo);
 - Incubar por 48 h;
 - Após incubar, retirar a solução dos poços e lavar com 100 µL de salina 0,9%.

Para o XTT

- Adicionar 200 µL de solução de XTT-Metassulfato (1:1 v/v) em cada poço pré-tratado e controles.
- Incubação das placas por 3 h em agitação no escuro a 37° C.
- Transferir 100 µL das soluções para outra placa e realizar a leitura colorimétrica em espectrofotômetro a 492 nm para determinação da densidade óptica (DO).

Para a contagem das UFC

- Remover os tratamentos e lavar com 100 µL de salina 0,9%;
- Adicionar 150 µL de solução salina 0,9% e ressuspender o biofilme;
- Realizar uma diluição seriada de 20 µL para 180 µL/ 0-7 quadrantes;
- Fazer plaqueamento em BHI Agar e BHI Agar + Cefuroxima para isolar a espécie *E. faecalis*. Em cada quadrante pipetar 2 gotas de 25 µL.
- Incubar em condições favoráveis para cada MO estudado e realizar a contagem das UFC/mL.

ANEXO D**Preparo da Solução XTT-Metassulfato**

→ Pesar 0,003 mg do XTT (Sigma-Aldrich, Switzerland)
→ Diluir em 10 mL de PBS, filtrar em filtro Millipore 0.2 µm (Kasvi, Curitiba-PR, Brasil) e estocar a -80 °C.

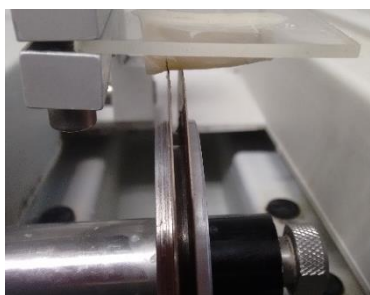
→ Pesar 0,0002 mg do Phenazine Methosulfate (Sigma)
→ Diluir em 10 mL de PBS, filtrar em filtro Millipore 0.2 µm (Kasvi, Curitiba-PR, Brasil)

*Apenas no momento do uso, misturar as duas soluções em proporções de 1:1 v/v.

ANEXO E**OBTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE DENTINA RADICULAR**



1. Raízes de dente bovino (incisivo central), separada da coroa através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob-refrigeração (água destilada/deionizada), após o corte, marcação de 1 mm abaixo da junção amelocementária.



2. Secção da porção radicular utilizando disco diamantado (Extec Diamond Wafer Blade, série 12205, 102mm X 0,3mm X 12,7mm, Extec Corporation, Enfield, CT, USA).



3. Preparo da parede do canal radicular de cada espécime com uma broca largo nº 6.



4. Disco da porção radicular fixado no acrílico com auxílio de cera pegajosa.

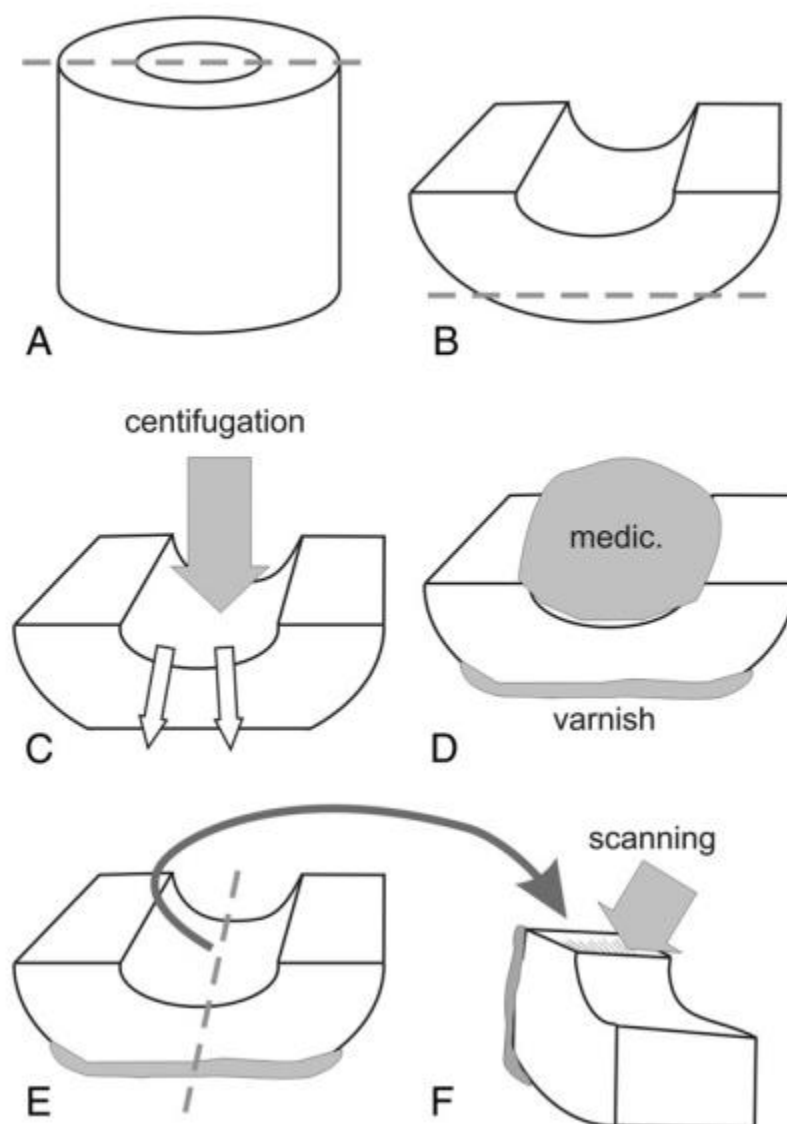


5. O espécime em formato cilíndrico foi novamente seccionado em duas metades semicilíndricas com um disco de diamante de 0.6mm (Isomet 5000; BuehlerLtd, LakeBluff, IL).



6. Remoção da camada de *smear layer* de ambos os lados do espécime pela imersão em solução com EDTA 17% em ultrassom por 3 min. e 5 min. com H₂O deionizada Esterilização em autoclave à 121° C por 15 minutos.

ANEXO F



Desenho esquemático da preparação da amostra. (Ma et al., 2011)

ANEXO G
MICROSCOPIA CONFOCAL
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (L13152)
Programa: LAS AF Leica Microsystems
Análise das imagens por Image J

(Concentrações do híbrido e do controle de Clorexidina
são correspondentes à 10x a Concentração Bactericida Mínima)

Biofilme Misto

1. Coletar uma alçada de microrganismos (5 – 10 UFC) para um tubo contendo 5 mL de BHI caldo com glicose 1% ou sacarose 0,5% e incubar por 24 h em condições favoráveis de crescimento para cada MO testado;
2. Para crescimento da D.O 0.5 após 24 h de crescimento, coletar uma alíquota de 500 µL da cultura e acrescentar em tubos contendo 5 mL de BHI caldo com glicose, incubar em CO₂ a 37° C;
3. Realizar uma diluição de 1000x em 4,5 mL de BHI caldo (supl.) com glicose(*E. faecalis*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *L. casei*) ou sacarose (*S. mutans*);
4. Misturar todos os microrganismos em proporções iguais;
5. Acrescentar 500 µL do em cada eppendorf;
6. Realizar centrifugações de 1400 x g, 2000 x g, 3600 x g e 5600 x g nessa sequência, duas vezes cada, por 5 min. Uma alíquota fresca de bactéria deve ser adicionada entre cada centrifugação e a antiga descartada;
7. Incubar por 14 dias;
8. Realizar trocas do meio de cultura de 48 em 48 h;
9. Retirar o espécime do eppendorf;
10. Colocar em uma placa de 48 poços
11. Acrescentar aos poços 10X a concentração de MBC dos antimicrobianos, e água deionizada estéril nos poços controles de cultura;
12. Agitar a placa contendo os espécimes por 1 h;
13. Incubar por 48 h;
14. Após incubar, retirar a solução dos poços e lavar com solução salina 0,9%
15. Seccionar os espécimes ao meio utilizando disco diamantado (Extex Diamond Wafer Blade, série 12205, 102mm X 0,3mm X 12,7mm, Extex Corporation, Enfield, CT, USA).
16. Aplicar 200 µL da solução do Kit Live/Dead (contendo SYTO 9 e Iodo propídeo) em cada poço (solução confeccionada de acordo com as instruções do fabricante);

-
17. Incubar por 30 min no escuro;
 18. Com auxílio de pinças, retirar os espécimes de dentina dos poços e secar levemente com lenço de papel macio;
 19. Montar o bloco de dentina sobre a lamínula do microscópio (Leica TCS SP5, Microsystems GmbH) utilizando o óleo do Kit, certificando-se que a parte que se quer analisar esteja para baixo;
 20. Comprimentos de onda de excitação e emissão: 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para Iodo propídeo;
 21. A fluorescência é captada pelo equipamento Leica TCS SP5, Microsystems GmbH;
 22. Objetiva de 63X (lente que deve ser usada com óleo de imersão);
 23. Software LAS AF Leica Microsystems com resolução de 1024 por 1024 pixels por imagem;
- OBS. Devem ser selecionadas mais de uma área para captação das imagens, sendo uma delas utilizada para realizar as imagens tridimensionais através da função Z step size;
24. A quantificação das bactérias vivas e mortas é realizada pelo programa image J 1,48.

Biofilme Multiespécies

1. Coletar uma alçada de biofilme supra e subgengival (1° ou 2° molar) de três doadores com idade entre 25-45 anos com o auxílio de uma cureta estéril e posteriormente transferir para um tubo contendo 5 mL de BHI caldo e incubar por 24 h em condições de anaerobiose;
2. Após 24 horas de crescimento, centrifugar a cultura (8000 rpm, 5 min), lavar com solução salina 0,9%, centrifugar novamente e ressuspender em BHI suplementado com glicose 1%;
3. Realizar uma diluição de 1000x em 4,5 mL de BHI caldo com glicose 1% e ajustar a concentração para 3×10^6 UFC/mL.
4. Acrescentar 500 µL do em cada eppendorf;
5. Realizar centrifugações de 1400 x g, 2000 x g, 3600 x g e 5600 x g nessa sequência, duas vezes cada, por 5 min. Uma alíquota fresca de bactéria deve ser adicionada entre cada centrifugação e a antiga descartada;
6. Incubar por 14 dias;
7. Realizar trocas do meio de cultura de 48 em 48 horas;
8. Retirar o espécime do eppendorf;

-
9. Colocar em uma placa de 48 poços
 10. Acrescentar aos poços 10X a concentração de MBC dos antimicrobianos, e água deionizada estéril nos poços controles de cultura;
 11. Colocar em uma placa de 48 poços
 12. Agitação da placa contendo os espécimes por 1 h;
 13. Incubar por 48 h;
 14. Após incubar, retirar a solução dos poços e lavar com solução salina 0,9%
 15. Seccionar os espécimes ao meio utilizando disco diamantado (Extec Diamond Wafer Blade, série 12205, 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm, Extec Corporation, Enfield, CT, USA).
 16. Aplicar 200 µL da solução do Kit Live/Dead (contendo SYTO 9 e Iodo propídeo) em cada poço (solução confeccionada de acordo com as instruções do fabricante);
 17. Incubar por 30 min no escuro;
 18. Com auxílio de pinças, retirar os espécimes de dentina dos poços e secar levemente com lenço de papel macio;
 19. Montar o bloco de dentina sobre a lamínula do microscópio (Leica TCS SP5, Microsystems GmbH) utilizando o óleo do Kit, certificando-se que a parte que se quer analisar esteja para baixo;
 20. Comprimentos de onda de excitação e emissão: 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para Iodo propídeo;
 21. A fluorescência é captada pelo equipamento Leica TCS SP5, Microsystems GmbH;
 22. Objetiva de 63X (lente que deve ser usada com óleo de imersão);
 23. Software LAS AF Leica Microsystems com resolução de 1024 por 1024 pixels por imagem;
- OBS. Devem ser selecionadas mais de uma área para captação das imagens, sendo uma delas utilizada para realizar as imagens tridimensionais através da função Z step size;
24. A quantificação das bactérias vivas e mortas é realizada pelo programa image J 1,48.

ANEXO H
Comitê de Ética em animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito citotóxico e ação antimicrobiana/antibiofilme de híbridos de curcumina e cinamaldeído sobre microrganismos de interesse endodôntico"**, Processo FOA nº 01195-2017, sob responsabilidade de Cristiane Duque apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de Dezembro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Dezembro de 2019.

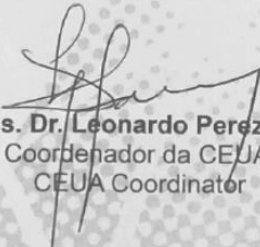
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Janeiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Citotoxicity and antimicrobial/antibiofilm effect of curcumin and cymamaldehyde hybrids on endodontic microorganisms"**, Protocol FOA nº 01195-2017, under the supervision of Cristiane Duque presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 12, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 15, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 15, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

Anexo I
Comitê de Ética em pessoas

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 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/subgengival 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 MENDONÇA

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 MENDONÇA

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

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