

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**Roberta Passos do Espírito Santo**

**Óleos essenciais do gênero *Citrus* como alternativa aos solventes  
endodônticos convencionais: importância no cenário pandêmico da COVID-19**

Juiz de Fora

2022

**Roberta Passos do Espírito Santo**

**Óleos essenciais do gênero *Citrus* como alternativa aos solventes  
endodônticos convencionais: importância no cenário pandêmico da COVID-19**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamaria Pessoa Pereira Leite

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Passos do Espírito Santo, Roberta.

Óleos essenciais do gênero Citrus como alternativa aos solventes endodônticos convencionais : importância no cenário pandêmico da COVID-19 / Roberta Passos do Espírito Santo. -- 2022.

94 p. : il.

Orientadora: . Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientadora: Anamaria Pessoa Pereira Leite

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2022.

1. Óleo essencial. 2. Fitoterapia. 3. Endodontia. 4. Guta-percha. 5. Odontologia. I. Rezende Barbosa Raposo, . Nádia , orient. II. Pessoa Pereira Leite, Anamaria , coorient. III. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU***



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Nº PROPP: 387.15082022.35-D

Nº PPG: 07/2022

**AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Tendo o(a) senhor(a) Presidente declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o(a) discente procedeu à apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação *Stricto sensu* e foi submetido(a) à arguição pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

**APROVADO (Conceito A)**

**APROVADO CONDICIONALMENTE (Conceito B)**, mediante o atendimento das alterações sugeridas pela Banca Examinadora, constantes do campo Observações desta Ata.

**REPROVADO (Conceito C)**, conforme parecer circunstanciado, registrado no campo Observações desta Ata e/ou em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora

Novo título da Dissertação/Tese (só preencher no caso de mudança de título):

Observações da Banca Examinadora caso:

- O discente for Aprovado Condicionalmente
- Necessidade de anotações gerais sobre a dissertação/tese e sobre a defesa, as quais a banca julgue pertinentes.

Banca de defesa realizada de forma não presencial de acordo com a Resolução nº 10/2022 CSPP . Todos os membros e a discente participaram da sessão de Defesa e a acompanharam na sua integralidade.

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

**INFORMAÇÕES**

- Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Programa de Pós-graduação, deverá ser tramitada para a PROPP, em Processo de Homologação de Dissertação/Tese, dentro do prazo de 90 dias a partir da data da defesa. Após a entrega dos dois exemplares definitivos, o processo deverá receber homologação e, então, ser encaminhado à CDARA.
- Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente(a).
- Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenadoria de Assuntos e Registros Acadêmicos da UFJF (CDARA) atestando que o processo de confecção e registro do diploma está em andamento.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo** - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Anamaria Pessoa Pereira Leite** - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Edmer Silvestre Pereira Júnior**

Universidade Federal de Alfenas

**Prof. Dr. Alessandro Aparecido Pereira**

Universidade Federal de Alfenas

**Roberta Passos do Espírito Santo**

Discente

Juiz de Fora, 16 / 08 / 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Edmer Silvestre Pereira Júnior, Usuário Externo**, em 16/08/2022, às 07:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nadia Rezende Barbosa Raposo, Professor(a)**, em 16/08/2022, às 08:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Duque de Miranda Chaves Netto, Professor(a)**, em 16/08/2022, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anamaria Pessoa Pereira Leite, Professor(a)**, em 16/08/2022, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Passos do Espírito Santo, Professor(a)**, em 16/08/2022, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria das Graças Afonso Miranda Chaves, Diretora**, em 16/08/2022, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro Aparecido, Usuário Externo**, em 17/08/2022, às 08:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0908708** e o código CRC **0406B54D**.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta conquista é uma criação coletiva que só se tornou real com a ajuda de todos que colaboraram nesta história. Agradeço primeiramente a minha orientadora, Profa Nádia, por acreditar em mim mesmo em momentos que eu achei que não seria capaz, obrigada pela confiança, amizade, paciência e por todos os ensinamentos. A minha co-orientadora, Profa Anamaria pela paciência e por prontamente me ajudar sempre que a procurei. A minha Profa Maria das Graças que sempre me apoiou e nos ajudou na elaboração desse trabalho. Ao Prof. Henrique Duque pela colaboração e amizade. Agradeço a todos os amigos do laboratório, em especial a Pollyana, Lorena, Alexandre e Zé Márcio que me ajudaram a construir esse trabalho. Agradeço à minha mãe Eliane, pelo amor, apoio e carinho incondicionais. Ao meu pai Roberto pelo eterno bom humor e dedicação. Agradeço a minha irmã Liliane e ao meu cunhado Tiaguinho pelo incentivo. À grande amiga e professora Aninha que sempre esteve me apoiando nessa caminhada. À minha segunda família Tio Hércio, Tia Neila, Tia Regina, Tio Breyenes e Tia Lili. Às minhas queridas amigas Fabíola e Michelle, pelo apoio e incentivo e que fizeram essa jornada mais fácil e divertida. À minha vovó Cleusa que sempre esteve presente ao meu lado. À toda minha família, em especial meus primos: Luquinha, Gabriel e Helizabeth. Agradeço ao Programa de Apoio a Qualificação (Proquali) da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo apoio. Agradeço à Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos e proteção.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## RESUMO

Mesmo com os avanços técnicos da Endodontia, são frequentes os insucessos endodônticos, sendo indicado o retratamento. A remoção do material obturador do canal radicular é uma etapa importante para o sucesso clínico do retratamento, sendo necessária a utilização de solventes químicos para remoção do material obturador, muitas vezes tóxicos à saúde humana e ao ambiente. Portanto, neste trabalho foram avaliadas a efetividade e a segurança de óleos essenciais pertencentes ao gênero *Citrus* como alternativa aos solventes endodônticos convencionais. Foram investigadas a capacidade solvente e a atividade biológica de 10 óleos essenciais (1 - *C. aurantium* var. *amara*, 2 - *C. deliciosa*, 3 - *C. deliciosa*, 4 - *C. sinensis*, 5 - *C. grandis*, 6 - *C. medica limonum*, 7 - *C. aurantium dulcis*, 8 - *C. reticulata*, 9 - *C. sinensis*, 10 - *C. sinensis*) e 3 controles (eucaliptol, Endosolv®E e clorofórmio). O perfil químico dos óleos essenciais foi avaliado por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; a efetividade dos óleos essenciais na remoção da guta-percha, por meio dos testes de desintegração; dureza por penetração e análise da superfície da guta percha, através de microscopia eletrônica de varredura. Também foram avaliados os potenciais biológicos: a) antimicrobiano por meio da análise turbidimétrica contra *E. faecalis* ATCC 51299 e *C. albicans* ATCC 10231 e a atividade antioxidante pelo método de sequestro de espécies reativas de oxigênio. A toxicidade foi avaliada pelo ensaio com 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) empregando fibroblastos murinos (L929). Todos os óleos apresentaram D-limoneo e  $\beta$ -mirceno na sua composição. O óleo 7 apresentou maior efetividade na remoção da guta percha. Todos os óleos apresentaram atividade bacteriostática contra *E. faecalis* ATCC 51299 e apenas os óleos 1, 5 e 6 apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* ATCC 10231. Os óleos 1-4, 6, 7, 9 apresentaram maior atividade antioxidante em comparação com os controles. Nenhuma substância avaliada demonstrou ser citotóxica para fibroblastos murinos (L929) até a concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ . Conclui-se que o óleo 7 é uma alternativa viável à utilização de solventes orgânicos convencionais, pois apresenta compostos químicos com capacidade efetiva de solubilização da guta percha, exibiu atividades antimicrobiana e antioxidante, além de baixa citotoxicidade. Ainda, representa uma opção natural que propicia o bem-estar aos pacientes que desejam soluções práticas,



mas que também estão preocupados nos impactos nos âmbitos social, ambiental e econômico que estes produtos podem causar.

**Palavras-chave:** Óleo essencial, Fitoterapia, Endodontia, Guta percha, Odontologia.

## ABSTRACT

Endodontic failures are frequent even with the technical advances in the field, and retreatment is indicated then. Removing the filling material from the root canal is an important step for the clinical success of retreatment, but it requires chemical solvents that are often harmful to health and the environment. Therefore, this study aimed to assess the efficacy and safety of essential oils belonging to the Citrus genus as an alternative to conventional endodontic solvents. It investigated the solvent capacity and the biological activity of ten essential oils (1 - *C. aurantium* var. *amara*; 2 - *C. Comida*, 3 - *C. Comida*, 4 - *C. sinensis*; 5 - *C. grandis*; 6 - *C. medica* limonum; 7 - *C. aurantium* dulcis; 8 - *C. reticulata*; 9 - *C. sinensis*; 10 - *C. sinensis*) and three controls (eucalyptol, Endossolv®E, and chloroform). Gas chromatography/mass spectrometry gave the chemical profile of the essential oils, disintegration tests assessed the oils' effectivity on gutta-percha removal, and scanning electron microscopy evaluated the durability by penetration and the gutta-percha's surface. Moreover, the biological assessments included: a) antimicrobial analysis through the turbidimetric analysis against *E. faecalis* (ATCC 51299) and *C. albicans* (ATCC 10231); b) antioxidant activity using the method of sequestration of reactive oxygen species; c) cell toxicity on L929 fibroblasts through 3-(4,5-dimethyl-2thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium (MTT) assay. D-limonene and  $\beta$ -myrcene were the two joint components found in all essential oils. Oil 7 was more effective in removing gutta-percha. All oils were bacteriostatic against *E. faecalis* (ATCC 51299), and only oils 1, 5, and 6 showed antifungal activity against *C. albicans* (ATCC 10231). Compared to control, oils 1-4, 6, 7, and 9 showed higher antioxidant activity. None of the oils were toxic against L929 cells up to 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . We concluded that oil 7 is a viable alternative to organic solvents since it presented chemical compounds with solubilization capacity, exhibited antimicrobial and antioxidant activities, and showed low cytotoxicity. Furthermore, this oil represents a natural option and offers welfare to patients seeking practical solutions but also looking for alternatives with less social, environmental, and economic impacts.

**Keywords:** Essential oil, Phytotherapy, Endodontics, Gutta-percha, Dentistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Citotoxicidade do clorofórmio em contato com os tecidos periapicais .....	22
Quadro 1	– Informações sobre as substâncias-teste avaliadas neste estudo.....	39
Esquema 1	– Testes laboratoriais realizados.....	40
Figura 2	– Etapas do ensaio de dureza por penetração.....	43
Figura 3	– Desintegração da guta percha nos períodos de tempo de 5 e 15 minutos.....	58
Figura 4	– Avaliação da dureza para as substâncias-teste.....	62
Figura 5	– Eletromicrografias da superfície dos cones de guta percha após imersão nas substâncias-teste por 5 minutos.....	65
Figura 6	– Eletromicrografia da superfície da guta percha sem exposição aos solventes.....	66
Figura 7	– Taxa de inibição de crescimento de <i>E. faecalis</i> por substância testada.....	68
Figura 8	– Atividade antioxidante das substâncias-teste pelo método de DPPH.....	72
Figura 9	– Viabilidade celular de fibroblastos murino (L929) em função dos tratamentos.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Perfil químico dos óleos essenciais obtidos experimentalmente e aqueles encontrados nas normas ISO correspondentes.....	49
Tabela 2	– Constituintes químicos dos óleos essenciais de interesse.....	52
Tabela 3	– Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Normalidade.....	53
Tabela 4	– Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Homogeneidade.....	54
Tabela 5	– Avaliação estatística dos dados pelo teste Kruskal-Wallis.....	54
Tabela 6	– Subconjuntos homogêneos, no tempo de 5 minutos, pelo teste de Kruskall Wallis.....	55
Tabela 7	– Subconjuntos homogêneos, no tempo de 15 minutos, pelo teste de Kruskall Wallis.....	56
Tabela 8	– Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Normalidade.....	59
Tabela 9	– Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Homogeneidade.....	59
Tabela 10	– Teste ANOVA em relação à média das forças de penetração aplicadas dependente do tratamento de superfície realizado.....	60
Tabela 11	– Subconjuntos das substâncias-teste pelo teste post-hoc de Ducan para o ensaio de dureza.....	61
Tabela 12	– Atividade antifúngica contra a <i>Candida albicans</i> das substâncias-teste avaliadas.....	67
Tabela 13	– As menores e maiores taxas de inibição de crescimento (%) do <i>E. faecalis</i> em relação a concentração encontrada.....	69
Tabela 14	– Atividade antioxidante das substâncias-teste pelo método de DPPH.....	71
Tabela 15	– Viabilidade celular (%) para cada substância-teste para a linhagem celular de fibroblasto murinho (L929).....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPPH	2,2-Difenil-1picril-hidrazil
MTT	3-(4,5-dimetil-2tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina transaminase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato transaminase
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CAT	Catalase
CFO	Conselho Federal de Odontologia
L929	Células de fibroblastos murino
GM07492-A	Células de fibroblastos sadios oriundos de pulmão humano
MBC	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CNS	Conselho Nacional de Saúde
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
MRC-5	Fibroblastos pulmonares humanos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GSH	Glutathiona
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
HG	Hesperetina-7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo
HE	Homoeriodictiol
IK	Índice de Kovatz
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>

ISO	International Organization for Standardization
Mf	Massa final
Mi	Massa inicial
Mp	Massa perdida
RPMI	<i>Meio do Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SISAB	Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica
Sig	Significância
SUS	Sistema Único de Saúde
SOD	Superóxido dismutase
$t'_R$	Tempo de retenção
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i>
ZOE	Óxido de zinco e eugenol

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
g	Gramma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Grau celsius por minuto
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
kV	Quilovolt
m/z	Massa carga
h	Hora
mm	Milímetro
N	Newton
mg/mL	Miligramma por mililitro
UI	Unidade internacional
Nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	TRATAMENTO ENDODÔNTICO E SUA IMPORTÂNCIA.....	18
2.2	INSUCESSO ENDODÔNTICO.....	18
2.3	RETRATAMENTO ENDODÔNTICO.....	20
2.4	REMOÇÃO DA GUTA PERCHA DO CANAL RADICULAR....	20
2.5	SOLVENTES ENDODÔNTICOS CONVENCIONAIS.....	22
2.5.1	<b>Clorofórmio (triclorometano)</b> .....	22
2.5.2	<b>Eucaliptol</b> .....	23
2.5.3	<b>Endosolv® E</b> .....	24
2.6	POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES (PNPIC).....	25
2.7	FITOTERAPIA.....	26
2.7.1	<b>Gênero <i>Citrus</i> uma alternativa viável à solventes convencionais</b> .....	27
2.7.2	<b><i>Citrus aurantium var. amara</i></b> .....	28
2.7.3	<b><i>Citrus deliciosa</i></b> .....	29
2.7.4	<b><i>Citrus limonia</i></b> .....	29
2.7.5	<b><i>Citrus sinensis</i></b> .....	30
2.7.6	<b><i>Citrus grandis</i></b> .....	31
2.7.7	<b><i>Citrus medica limonum</i></b> .....	32
2.7.8	<b><i>Citrus aurantium dulcis</i></b> .....	33
2.7.9	<b><i>Citrus reticulata</i></b> .....	33
2.8	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	34
2.8.1	<b>Métodos alternativos ao uso de animais</b> .....	34
2.8.1.1	Cultura de células.....	35
2.8.2	<b>Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i></b> .....	35
2.8.3	<b>Atividade antioxidante</b> .....	36
2.8.3.1	Método de sequestro de espécies reativas pelo 2,2-DIFENIL- 1PICRIL-HIDRAZIL (DPPH).....	37
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	38



3.1	GERAL .....	38
3.2	ESPECÍFICOS.....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	AMOSTRAS.....	39
4.2	PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	40
4.3	TESTE DE DESINTEGRAÇÃO.....	42
4.4	ENSAIO DE DUREZA.....	42
4.5	ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DOS CONES DE GUTA PERCHA..	43
4.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	44
4.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	45
4.8	CITOTOXICIDADE.....	46
<b>4.8.1</b>	<b>Linhagem celular.....</b>	<b>46</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Preparo das substâncias-teste.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Viabilidade celular.....</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.1	PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	49
5.2	TESTE DE DESINTEGRAÇÃO.....	53
5.3	ENSAIO DE DUREZA.....	58
5.4	ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DOS CONES DE GUTA PERCHA..	64
5.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	66
5.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	70
5.7	CITOTOXICIDADE.....	74
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é um procedimento odontológico conservador que envolve múltiplas etapas (da abertura da câmara pulpar até o selamento coronário), as quais exigem planejamento para que o mesmo seja exitoso (SOUZA et al., 2021). É necessário em dentes cujo tecido pulpar se tornou irreversivelmente inflamado ou necrótico (SOARES, 2018). Essa terapia consiste na remoção da polpa dentária, no preparo químico-mecânico do canal radicular e posterior obturação (NEELAKANTAN, 2017). Atualmente, o material mais utilizado na obturação do canal é a guta percha associada ao cimento à base óxido de zinco e eugenol (AKHLAGHI, 2013; CARVALHO, 2020).

As principais causas de insucessos endodônticos são resistência microbiana, canais tratados de forma insatisfatória, sobreobturação, obturação aquém do ápice ou falhas na condensação, entre outras (PRADA, 2019; YOUSUF, 2015). Os microrganismos mais frequentemente associados ao fracasso são os *Enterococcus faecalis*, seguido pela *Candida albicans* (DUMANI, 2012; KUMAR, 2015; SWIMBERGHE, 2019).

A grande diferença entre a terapia endodôntica primária e o retratamento consiste na remoção do material endodôntico (DEL FABRO, 2016). Para remoção do material obturador (guta percha e cimento) do canal radicular, o método mecânico (uso de limas e brocas) associado ao químico (solventes) é o mais utilizado (CAMÕES, 2010). Os solventes mais amplamente empregados são o clorofórmio, o tetracloroetileno e o eucaliptol, tendo como desvantagens a alta carcinogenicidade, citotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e alterações renais (AKHALAGHI, 2013; ASCHENGRAU, 2017; CEDERBERG, 2010; CICHOCKI, 2019; GUYLTON, 2014; KHALLEF, 2017; LASH, 2019; LUO, 2019; MEDEIROS, 2019; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO, 2007; RIBEIRO, 2008; VAJRABHAYA, 2004; WANG, 2018). Destaca-se a necessidade de se evitar o uso dos mesmos (VERMA, 2018).

Um solvente endodôntico ideal deve apresentar baixa citotoxicidade, ausência de carcinogenicidade, alto efeito solvente, baixa tensão superficial, ação rápida, fácil manipulação e vida útil longa (TAMSE, 1986; WENNBERG, 1984). Atualmente, tem-se uma nova postura de consumidores que se preocupam com processo produtivo, com a sustentabilidade do produto, visando um menor impacto ao meio ambiente e

maior responsabilidade social optando por produtos mais saudáveis e sustentáveis. O mercado verde tem aumentado de forma elevada nos últimos anos, deixando evidente um nicho em expansão (LOPES, 2014). Observando esse cenário, a utilização de fitoterápicos, como solventes endodônticos, poderia impulsionar a agricultura familiar e ainda diminuir os impactos ambientais e toxicológicos dos solventes orgânicos (REHMAN, 2013).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, (VIDAL, 2021), gerando assim subprodutos industriais com propriedades bioativas (ARAUJO, 2020), pois as frutas cítricas apresentam em suas cascas glândulas produtoras de óleos essenciais (DUGO, 2002), que são compostos voláteis, muito utilizados comercialmente na fabricação de medicamentos (KHEDMAT, 2015) e poderiam ser uma alternativa viável como solventes endodônticos (REHMAN, 2013).

Nos últimos anos tem-se aumentado o interesse nas propriedades biológicas dos óleos essenciais, particularmente devido aos seus efeitos antioxidantes e antimicrobianos (ARAUJO, 2020). Diversos estudos têm demonstrado a utilização do óleo de casca de laranja como medicamento odontológico, sendo um possível solvente endodôntico (BAYRAM, 2017; CASTRO, 2018; DEMIBURGA, 2016; TREVISAN 2017). No entanto, na Odontologia, alguns estudos experimentais envolvendo o uso de óleos de laranja não identificaram botanicamente a espécie vegetal utilizada, tão pouco qual a estrutura (caule, sementes ou casca) que deu origem ao óleo, bem como a caracterização desse (BAYRAM, 2017; DEMIRBURGA, 2016; KARATAS, 2016; PALHAIS, 2017; REHMAN, 2013; YADAV, 2016).

Diante do panorama de necessidade de cuidados endodônticos antes, durante e/ou após a pandemia de COVID-19, é importante adaptar as práticas odontológicas, por meio da adoção de protocolos que atenuem os riscos de transmissão viral, o que inclui não só a utilização de equipamentos de proteção individual; a otimização do rastreamento, da triagem e do diagnóstico dos pacientes, bem como a redução do número de visitas do paciente para realizar o tratamento endodôntico por meio de maior eficiência (HAAS, 2021). Dentro deste contexto, neste trabalho foi avaliada a efetividade e a segurança de 10 óleos essenciais pertencentes ao gênero *Citrus* como alternativa aos solventes endodônticos convencionais, visando à otimização do procedimento endodôntico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TRATAMENTO ENDODÔNTICO

O tratamento endodôntico é um procedimento odontológico amplamente utilizado e necessário em dentes cujo tecido pulpar se tornou irreversivelmente inflamado ou necrótico (SOARES, 2018). Essa terapia consiste na remoção da polpa dentária, preparo mecânico e químico do canal radicular e posterior obturação (NEELAKANTAN, 2017).

Entre as principais causas que levam a sua indicação estão as lesões cáries extensas com contaminação da polpa dentária, lesões não cáries como abrasão e abfração, necessidade de instalação de núcleos e pinos protéticos, entre outros (SOARES, 2018).

A obturação do canal radicular pode ser realizada com diversos materiais odontológicos, sendo a guta percha associada ao cimento à base óxido de zinco e eugenol o material mais utilizado na prática clínica (AKHLAGHI, 2013).

O sucesso endodôntico está diretamente relacionado à desinfecção adequada do canal, à excelência na modelagem delimitando um bom selamento coronal e apical, seguido da reabilitação do dente na arcada dentária, devolvendo função a este. O tratamento endodôntico quando bem executado evita dor, lesões periapicais e perda dentária (ESTRELA, 2014).

### 2.2 INSUCESSO ENDODÔNTICO

Fracassos na terapia endodôntica são frequentes e atingem em torno de 10% dos dentes tratados (YOUSUF, 2015). A etiologia do insucesso é diversificada e abrange desde tratamentos endodônticos insatisfatórios, a tratamentos adequados - porém associados a fatores microbianos, não-microbianos, intrínsecos ou extrínsecos (BERGENHOLTZ, 2016; PRADA, 2019).

No que concerne aos fatores microbianos, temos que: os canais tratados de forma insatisfatória, com obturação aquém do ápice ou falhas na condensação, apresentam microbiota semelhante à infecção primária (PRADA, 2019). Microbiota esta do tipo mista, contendo equilíbrio entre bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas, contendo cerca de 4 a 7 linhagens bacterianas (PEREIRA, 2017, POURHAJIBAGHER, 2017).

No caso de tratamento endodôntico bem executado, com correto preparo químico-mecânico e realização de medicações intracanal, as bactérias podem permanecer em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários e espaços radiculares, ocasionando o insucesso endodôntico (BERGENHOLTZ, 2016; ZUBIZARRETA, 2019). Nestes casos, geralmente observam-se monoinfecções associadas às bactérias Gram-positivas ou infecções mistas. Os microrganismos mais frequentemente associados aos casos de retratamento são *Enterococcus faecalis*, seguido pela *Candida albicans*, sendo estes resistentes ao uso de medicamentos como o hidróxido de cálcio (ASHRAF, 2007; DUMANI, 2012; KUMAR, 2015; SWIMBERGHE, 2019).

O retratamento endodôntico causado por formação de biofilme extra-radicular é raro, cerca de 4% dos casos de retratamento (SIQUEIRA, 2000). Pode-se citar a sobreobturação como causa de insucesso endodôntico, representando cerca de 10,2% dos casos de retratamento (YOUSUF, 2015). O paraformaldeído e cimentos endodônticos previamente à presa apresentam toxicidade (AN, 2019), já o cone de guta percha e os cimentos endodônticos, após a presa, apresentam biocompatibilidade. Autores relataram que esse insucesso está mais relacionado ao selamento apical, já que na sobreobturação o selamento apical é deficiente, permitindo que fluídos apicais ricos em glicoproteínas sejam levados ao interior do canal, servindo de substratos aos microrganismos resistentes (WASHIO, 2019; SIQUEIRA, 2000; SHEMESH, 2011). Porém, outra vertente defende que, durante a sobreinstrumentação, raspas de dentina infectada sejam levadas para o interior da lesão periradicular perpetuando a infecção (NG, 2008).

O selamento coronário insatisfatório também pode ser responsável pelo insucesso endodôntico, haja vista a solubilidade do cimento radicular que, em contato com a saliva, causa a recontaminação do canal (BRITO-JUNIOR, 2009). Segundo Siqueira e colaboradores (2000), a média de dias para a contaminação é de 30 a 60 dias. Diversas são as causas da perda do selamento coronário: fratura da restauração (provisória ou permanente) ou da estrutura dental, microinfiltração através do selador e lesão cariiosa (LASKE, 2019).

Outros motivos de insucessos podem estar associados aos fatores não microbianos, como reação de corpo estranho, incluindo pedaços de cone de papel ou

o algodão utilizados durante o preparo. Ainda, têm-se os acidentes transoperatórios: perfurações radiculares, fratura de limas, insucesso no tratamento químico-mecânico, obturação inadequada e calcificações no canal radicular (DEL FABRO, 2016).

### 2.3 RETRATAMENTO ENDODÔNTICO

O retratamento endodôntico é realizado a partir do seguinte protocolo: inicia-se pela remoção da restauração coronária e dos retentores intra-radiculares, com subsequente esvaziamento do canal radicular (remoção do material obturador), reinstrumentação, medicação intracanal e obturação do canal (DEL FABRO, 2016).

Essa tese enfatiza a etapa de remoção do material obturador do canal radicular. A grande diferença entre a terapia endodôntica primária e o retratamento consiste na remoção do material endodôntico (FIEDMAN et al., 2002). Maisto (1975) classificou os materiais obturadores quanto ao estado: sólido (cones de guta percha e prata) ou plástico (cimentos e pastas). A guta percha é um polímero de hidrocarboneto extraída da espécie *Paladium*, podendo apresentar-se como isopreno ou metilbutadieno (SIQUEIRA, 2000), sendo o material obturador mais utilizado no tratamento endodôntico (AKHLAGHI, 2013).

### 2.4 REMOÇÃO DA GUTA PERCHA DO CANAL RADICULAR

A remoção do material obturador (guta percha e cimento) pode ser realizada por meios térmicos, mecânicos, químicos ou pela combinação destes.

Os meios térmicos usados são Touch'n Heat, System B e os calcadores de Donaldson ou de Paiva, que devem ser aquecidos e levados ao canal radicular, evitando aquece-los a vermelho-rubro pois a alta temperatura pode causar injúrias nos tecidos periodontais (LEE, 1998). Os meios mecânicos mais empregados são as limas Hedstrom, as quais são inseridas entre a parede do canal radicular e o material obturador, com técnica de giro no sentido horário e apresentando grande êxito nas obturações pouco compactadas (HUANG, 2007). Limas tipo K, utilizadas para a remoção de material endodôntico bem compactado, são inseridas no canal radicular obturado e rotacionadas no sentido horário (de uma a duas voltas), em seguida são tracionadas no sentido ápice–coroa, removendo assim a guta percha obturadora. O

ultrassom também pode ser utilizado (JAIN, 2015) e, na atualidade ressalta-se o uso dos sistemas rotatórios (BHAGAVALDAS, 2017; CASTRO, 2018).

As brocas Largo e Gates-Glidden (sem corte na ponta) são muito utilizadas para a remoção do material obturador (KAYAHAN, 2017). O corte é efetuado pela lateral da broca, o que diminui as iatrogenias como a perfuração do canal radicular (HUANG, 2007). As brocas Peeso também podem ser empregadas, se manipuladas com cautela, pois apresentam corte em sua ponta, o que pode ocasionar perfurações, desvios e degraus (BRANTLEY, 1994). Todas as brocas são acopladas à caneta de baixa rotação e contra-ângulo com sentido de rotação à direita. Devido à força de atrito estática e levando em consideração o limite de resistência ao cisalhamento do material da broca, deve-se inseri-la no canal radicular em movimento, visando reduzir a possibilidade de fraturas (BARNES, 2011; HUANG, 2007; KAYAHAN, 2017). Os meios mecânicos para a remoção de guta-pecha do canal radicular podem ser associados aos solventes para potencializar a retirada do material obturador (HUANG, 2007; JAIN, 2015).

Após a remoção do terço cervical da guta percha, por quaisquer métodos supracitados, o espaço antes preenchido pelo material obturador é substituído por um solvente de escolha que deve atuar por alguns minutos. O terço médio do canal deve ser removido com limas tipo Kerr ou Hedstrom, sempre alternando a irrigação entre o hipoclorito de sódio e o solvente. No terço apical, deve-se realizar a remoção com limas, evitando a utilização do solvente e conseqüente extravasamento com danos na região periapical (CAMPELLO, 2019; COLOMBO, 2016; HUWANG, 2015). O método puramente mecânico apresenta riscos, tais como perfurações do canal radicular, confecção de degraus, desvios na forma original do canal e fraturas dos instrumentos (HUANG, 2007; JAIN, 2015).

Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença coronavírus (COVID-19) causada pelo vírus SARS-CoV-2 como pandemia. Seu principal meio de transmissão se dá por gotículas de saliva, assim os Cirurgiões-Dentistas são considerados grupo de maior risco entre os profissionais de saúde (JAMAL, 2020), sendo o retratamento endodôntico uma urgência odontológica. Após a pandemia, o tempo de realização desse procedimento deve ser diminuído, conforme estudo realizado por Olivieri e colaboradores (2021) reduzindo assim o tempo de exposição a aerossóis.

Assim, a associação dos métodos químicos e mecânico fornecem mais segurança e rapidez no atendimento e, por isso, é mais utilizada (OYAMA, SIQUEIRA e SANTO, 1999; ROSA, 2007).

## 2.5 SOLVENTES ENDODÔNTICOS CONVENCIONAIS

Solventes são substâncias que agem amolecendo a guta percha e o cimento obturador facilitando a ação dos instrumentos no canal radicular (CAMÕES, 2010). Diversos solventes orgânicos têm sido utilizados e estudados para a remoção da guta percha do canal radicular. Ressalta-se que grande parte desses são tóxicos e sua utilização deveria ser evitada (VERMA, 2018).

### 2.5.1 Clorofórmio (triclorometano)

O clorofórmio é um solvente orgânico amplamente empregado na Odontologia, sendo considerado padrão-ouro para a remoção de guta percha do canal radicular, por possuir elevada capacidade de dissolução, ação rápida e atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis* (DAGNA, 2017; SCOTT, 2006). Estudo *in vitro* realizado por Chutich (1998) demonstrou que seu uso é seguro, pois a dose em contato com os tecidos periapicais é pequena, não apresentando toxicidade. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que o clorofórmio apresenta elevada citotoxicidade em contato com os tecidos periapicais, gerando necrose óssea com possibilidade de perda dentária (Figura 1) (AKHLAGHI, 2013; VERMA, 2018).

Figura 1 – Citotoxicidade do clorofórmio em contato com os tecidos periapicais.



A: tecido necrótico após a exposição ao clorofórmio, B: aspecto clínico dias após a injúria. Fonte: Akhlaghi (2013).



O clorofórmio apresenta distintas propriedades negativas como: citotoxicidade, evidenciada em diversos estudos (AKHALAGHI, 2013; MEDEIROS, 2019; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO, 2007; RIBEIRO, 2008; VAJRABHAYA, 2004), hepatotoxicidade (WANG, 2018), degeneração da mucosa olfativa em ratos (ZHENG, 2018), carcinogenicidade em testes com animais (MEDEIROS, 2019; VITTOZZI, 2000), alterações estruturais no DNA como rupturas e mutações (KHALLEF, 2017). Sendo, portanto, classificado pela Agência Internacional de Pesquisa como cancerígeno do grupo 2B (IARC, 2003). Desde a identificação do potencial carcinogênico do clorofórmio, é crescente o interesse em identificar um solvente eficaz e alternativo para o uso odontológico (DAGNA, 2017).

### 2.5.2 Eucaliptol

O eucaliptol (1 metil, 4 isopropil ciclo-hexano, 1-4 óxido) é outro solvente de uso odontológico com capacidade de dissolver a guta percha (FARIA-JÚNIOR, 2011; GOMES, 2013, MAGALHÃES, 2007; TANOMARU, 2010), tendo ação semelhante ao óleo de laranja (KARATAS, 2016) e com menor efetividade quando comparado ao clorofórmio e ao tetracloroetileno (GOMES, 2013; FARIA-JÚNIOR, 2011; KARATAS, 2016). No entanto, alguns trabalhos mostraram que o eucaliptol não apresentou ação emoliente, dado o elevado tempo necessário para a platificação do material obturador (CAMÕES, 2010, ROSA, 2007).

Aldoghaim (2018) analisou o óleo essencial extraído de diversas espécies de eucalipto, e seu principal componente foi o 1,8 cineol. Tendo constatado atividade antimicrobiana menos efetiva contra a *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Segundo Oliveira (2011) o composto fitoquímico 1,8 cineol aumenta a permeabilidade de membrana, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos, sendo descrito como detentor de efeito antimicrobiano marginal.

O eucaliptol, *in vitro*, foi citotóxico para células de linfoma de camundongo, nas concentrações de 2,5 a 10 µL/mL, porém não foi capaz de alterar o DNA destas células (RIBEIRO, 2006), sobre a efetividade na remoção do material obturador, dos canais radiculares de molares, foi provado que o o eucaliptol não auxiliou a remoção do material obturador (CAMPBELLO, 2013).

### 2.5.3 ENDOSOLV® E

Endosolv® E é composto por 92,30 gramas do princípio ativo tetracloroetileno e excipientes (quantidade suficiente para 100 gramas) (ENDOSOLV® E – SEPTODONT, PARIS, FRANÇA). Representa outro solvente orgânico muito usado em Odontologia, com alta capacidade emoliente (BAYRAM, 2017; BHAGAVALDAS, 2017; FERREIRA, 2017), curto tempo de utilização (2 minutos) e elevada efetividade (MUSHTAQ, 2012). Associa-se, quando necessário, aos outros solventes como o citral e o eucaliptol para aumentar o potencial dessas substâncias (FARIA JUNIOR, 2011).

Estudos realizados em ratos demonstram alterações renais e hepáticas relacionadas ao tetracloroetileno (CICHOCKI, 2019; LUO, 2019). Alterações no DNA do fígado também foram observadas (CEDERBERG, 2010). Também existem evidências da associação do tetracloroetileno ao câncer de bexiga, linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo, sugerindo potencial carcinogênico e neurotóxico (ASCHENGRAU, 2017; GUYLTON, 2014). Segundo Lash (2019), o tetracloroetileno é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no grupo 2, ou seja, como provável agente carcinogênico para os seres humanos. Ademais, de acordo com Getz (2012), pessoas expostas ao tetracloroetileno, podem apresentar alteração visual com incapacidade discriminatória de cores.

Diante do exposto, identifica-se que o cenário atual da Endodontia consiste na utilização de solventes orgânicos com consideráveis impactos negativos na saúde humana. Assim sendo, é premente a necessidade de se disseminar informações sobre a toxicidade e a biocompatibilidade dos materiais utilizados (VERMA, 2018). Um solvente endodôntico ideal deve apresentar baixa citotoxicidade, ausência de carcinogenicidade, elevado efeito solvente, baixa tensão superficial, ação rápida, fácil manipulação e vida útil longa (CAMPELLO, 2019; TAMSE, 1986; WENNERBERG 1984).

## 2.6 POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES (PNPIC)

A OMS designa a Medicina Tradicional e Complementar como um conjunto heterogêneo de práticas, saberes e produtos agrupados que não pertencem ao escopo da medicina convencional (SOUZA, 2017).

A discussão em torno das Medicinas Tradicionais Complementares e Integrativas vem crescendo consideravelmente em muitos países. No Brasil, essa prática já era aplicada em municípios e estados, sendo um dos pioneiros na implementação dessas práticas na saúde pública nas Américas (SILVA, 2020).

No Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) foi aprovada por unanimidade pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) e publicada na forma das portarias ministeriais nº 971, de 3 de maio de 2006, e nº1600, de 17 de julho de 2006, visando à prevenção e recuperação de patologias; promoção de saúde; garantir qualidade, eficácia, eficiência e segurança, quanto ao uso das práticas complementares, além de estimular o uso das terapias alternativas para o tratamento de doenças (BRASIL, 2006). Os recursos terapêuticos inicialmente reconhecidos e com possibilidade de oferta no SUS foram: medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia, plantas medicinais, fitoterapia, medicina antroposófica e termalismo-crenoterapia. Entre 2017 e 2018, ampliaram-se os recursos com arteterapia, ayurveda, biodança, dança circular, meditação, musicoterapia, naturopatia, osteopatia, quiropraxia, reflexoterapia, reiki, shantala, terapia comunitária integrativa, yoga, aromaterapia, apiterapia, bioenergética, constelação familiar, cromoterapia, geoterapia, hipnoterapia, imposição de mãos, ozonioterapia e terapia de florais (SILVA, 2020).

Apesar da importância da PNPIC, existem pontos frágeis na sua implementação, tais como a dificuldade na ampliação do acesso, na oferta e no financiamento para o fortalecimento desses serviços; precária formação de profissionais, a carência de recursos materiais e de infraestrutura (SOARES, 2019). Por outro lado, o crescimento da procura dessas políticas por parte da população se deve ao reposicionamento do paciente como o centro do atendimento, a relação profissional-paciente é o elemento fundamental na terapêutica, meios de tratamentos simples, diminuindo de forma significativa o uso de tecnologias, tendo como categoria central a saúde e não a doença (SANTOS e TESSER, 2012).

A procura por essas práticas vem crescendo nos últimos anos, conforme o Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica (SISAB) do Departamento de Atenção Básica do Ministério da Saúde. Em 2021 foram registrados 384.156 atendimentos (BRASIL, 2021), o que mostra que a população aderiu a essa prática (BRASIL, 2021).

## 2.7 FITOTERAPIA

Conforme Resolução nº 26, de 13/05/2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicada no diário oficial de 14/05/2014, no capítulo 1, Seção II, Artigo 2º, parágrafo 1 são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que se caracterizem pela constância de sua qualidade (BRASIL, 2014).

Em 1978, após debates mundiais sobre a regulamentação da fitoterapia, obteve-se a Declaração de Alma Ata na qual se defendeu o uso de plantas medicinais e fitoterápicos como cuidado paliativo, curativo e profilático (MACEDO, 2016).

Através do Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006, artigo 1º, ficou aprovado a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, entre os objetivos desse decreto destacam-se a promoção, o desenvolvimento de tecnologias e inovações na área de fitoterapia, visando a inclusão da agricultura familiar nas cadeias e nos arranjos produtivos das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos e promovendo um desenvolvimento sustentável (BRASIL, 2006). Por fim, no ano de 2008, o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos foi aprovado (BRASIL, 2009). No mesmo ano o Conselho Federal de Odontologia (CFO) reconheceu e regulamentou o uso da fitoterapia como prática integrativa e complementar à saúde bucal, através da Resolução do CFO, nº82, de 25 de setembro de 2008. Toda essa trajetória permitiu a inserção da fitoterapia e das plantas medicinais no Sistema Único de Saúde, promovendo assim maior acesso da população a esse método.

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade com alta variabilidade de plantas medicinais (FRANCO, 2018). Observando esse cenário, a utilização de fitoterápicos, como solventes endodônticos, poderia impulsionar a agricultura familiar, diminuir os impactos ambientais e toxicológicos dos solventes orgânicos (BRASIL, 2006; REHMAN, 2013). Levando em consideração o que foi explicitado acima, os óleos

essenciais extraídos de plantas e amplamente utilizados na aromaterapia, cosmetologia, formulação de medicamentos e suplementos (ABDEL-DAIM, 2020) poderiam ser uma alternativa viável como solvente endodôntico (REHMAN, 2013).

### **2.7.1 Gênero *Citrus* uma alternativa aos solventes convencionais**

As plantas do gênero *Citrus* (pertencem à família *Rutaceae*, ordem *Sapindales*, classe *Magnoliopsida*) são nativas do sudeste da Ásia e da bacia do Mediterrâneo. Encontraram no solo brasileiro condições excelentes para alcançar alto nível de qualidade (DUARTE, 2016). Diversas são as frutas do gênero *Citrus* como as laranjas, tangerinas, mandarinas e limões (DUAN et al., 2017; HUNG et al., 2017Z; ZHANG et al., 2017), mundialmente consumidas devido às características agradáveis como cor, aroma e sabor doce (CHOUZA, 2011; POLTI, 2013). O Brasil é o maior produtor de frutas cítricas do mundo, produzindo cerca de 20 milhões de toneladas de laranja, limão e tangerina, o que representa cerca de 25% da produção mundial (MERLADETE, 2021).

É grande a variabilidade de nutrientes e bioativos encontrados em suas frutas como: vitaminas C e B, carotenos, flavonoides, glicosídeos, cumarinas, limonoides, fibras, minerais e fenilpropanoides (DUAN et al., 2017; HUNG et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

O interesse por produtos ecológicos que apresentem baixo impacto ambiental e sejam seguros ao consumidor tem aumentado nos últimos anos. Nessa perspectiva, a composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais do gênero *Citrus* têm despertado o interesse (ARAUJO, 2020), pois as frutas cítricas apresentam em suas cascas, glândulas produtoras de óleos essenciais (DUGO, 2002). Tais compostos voláteis são profusamente utilizados comercialmente na fabricação de medicamentos (KHEDMAT, 2015).

Nos últimos anos, tem-se avolumado o interesse pelas propriedades biológicas dos óleos essenciais, particularmente devido aos seus efeitos antioxidantes e antimicrobianos (ARAUJO, 2020). Diversos estudos têm demonstrado a utilização do óleo de laranja como medicamento odontológico sendo um possível solvente endodôntico (BAYRAM, 2017; CASTRO, 2018; DEMIBURGA 2016 TREVISAN 2017).

Nos estudos científicos odontológicos, com óleo de laranja, não é possível identificar a planta utilizada, qual a estrutura (caule, sementes ou casca) que deu

origem ao óleo, bem como a caracterização do mesmo (BAYRAM, 2017; DEMIRBURGA, 2016; KARATAS, 2016; PALHAIS, 2017; REHMAN, 2013; YADAV, 2016).

### **2.7.2 *Citrus aurantium var. amara***

Conhecido popularmente como laranja amarga, a *Citrus aurantium var. amara* é muito utilizada na culinária e na medicina chinesa (SHEN,2020). Apresenta atividade antitumoral, antiinflamatória, antibacteriana e antioxidante (SUNTAR, 2018; SHEN, 2017). Seu extrato, na dose terapêutica, não apresenta efeitos indesejáveis em humanos (SUNTAR, 2018), sendo os componentes bioativos pouco conhecidos (YU, 2020).

O óleo essencial extraído da *C. aurantium var. amara* contém principalmente limoneno, linalol e  $\beta$ -mirceno, podendo ocorrer variabilidade de composição dependendo do local de cultivo (SUNTAR, 2018). No estudo realizado por Shen (2017) as principais substâncias foram o linalol,  $\alpha$ -terpineol, limoneno e acetato de linalil.

Yu (2020) realizou estudo de metabólitos secundários a partir de flores, frutos, folhas, caules e raízes empregando a cromatografia líquida de alta eficiência e identificou 295 metabólitos, sendo 89 fitoquímicos (19 flavonas, 27 flavononas, 12 polimetoxiflavonóides, 4 cumarinas, 15 alcaloides, 1 limonoides).

Na análise cromatográfica das flores, foi evidenciada elevada concentração de flavonoides, homoeriodictiol (HE) e hesperetina-7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (HG). O HE mostrou-se mais efetivo que o HG na inibição da resposta induzida por lipopolissacarídeos, inibindo a produção de interleucina 6, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina 1  $\beta$ , resultando em efeito antiinflamatório (SHEN,2020).

### 2.7.3 *Citrus deliciosa*

Popularmente conhecida como bergamota ou tangerina, elas são muito consumidas na dieta brasileira. Suas cascas após o consumo contêm grande quantidade de compostos fenólicos, os quais apresentam elevada atividade antioxidante (ATES, 2017; BALASUNDRAM, 2006; SAHIN, 2015). Nawaz (2020) ressalta a possibilidade de existir diferenças na atividade antioxidante relacionadas ao período de maturação do fruto.

A composição química do óleo essencial, em diferentes condições de extração e tempo de colheita, não se modifica qualitativamente, mas sim quantitativamente; sendo o limoneno o composto com maior concentração (MINTEGUIAGA, 2017).

O óleo essencial obtido das folhas da *C. deliciosa*, analisado por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, tem como principal constituinte o limoneno, apresentando divergências em sua concentração de 91,27% no trabalho conduzido por Dias (2020) e de 72% no experimento desenvolvido por Dugo (2011).

### 2.7.4 *Citrus limonia*

Popularmente conhecido como limão cravo ou limão rosa. Os óleos extraídos de suas sementes são ricos em ácidos graxos, tais como o caprílico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico e araquídico (REDA, 2005). Já os óleos obtidos de suas folhas, apresentam o limoneno (29,9%), o  $\beta$ -pineno (12,0%), o sabineno (9,0%), o citronelal (9,0%) e o citronelol (5,8%) (MARTINS, 2017).

No estudo conduzido por Abdel-daim (2020), os principais componentes do óleo foram D-limoneno (20,38%), 5-metil-pentadecano (5,33%), (n)-mentol, (5,18%), 3,7-dimetil- (E) -2,6-octadienal (5,16%), 3,7-dimetil-2,6-octadienal (4,92%), e nonadecano (4,40%). Porém, no experimento de Amorim (2016), o óleo extraído da casca do fruto da *C. limonia* apresentou 65,7% de limoneno, 12,3%  $\gamma$ -terpineno, 1,9% mirceno, 1,6%  $\alpha$ -terpineno, 1,2% sabineno.

Chen (2020) avaliou a capacidade antioxidante da casca, do fruto e do suco da *C. limonia*, através do método de sequestro de espécies reativas pelo 2,2-difenil-1-picril-hidrazi, encontrando que a casca do fruto apresenta maior atividade antioxidante do que o suco da fruta.

Nos ensaios de citotoxicidade envolvendo células de fibroblastos sadios oriundos de pulmão humano (GM07492-A), observou-se que concentrações  $\geq 156,3$   $\mu\text{g/mL}$  reduziram significativamente a viabilidade celular, quando comparada ao controle negativo (MARTINS, 2017).

O extrato da casca do fruto de *C. limonia* apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis* com concentração inibitória mínima (CIM) de 260  $\mu\text{g/mL}$  e 140  $\mu\text{g/mL}$ , em relação à *Candida albicans*, foi de  $>1000$   $\mu\text{g/mL}$  e 920  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando como solvente o metanol e o água destilada, respectivamente (SALEEM, 2020).

Seu óleo essencial apresentou atividade protetora contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, medicamento quimioterápico utilizado no tratamento de neoplasias malignas (ABDEL-DAIM, 2020) e atividade antiinflamatória, provavelmente relacionado à elevada concentração de limoneno (AMORIM, 2016).

Cabe destacar que a esculetina é um composto fenólico isolado da *C. limonia*, o qual apresenta atividade antiproliferativa potente em linhagens celulares de carcinoma pulmonar NCI-H358 e NCI-H1299 (LEE, 2017).

### **2.7.5 *Citrus sinensis***

Popularmente conhecida como laranja, esta espécie vegetal apresenta vários grupos de compostos químicos presentes tanto nas folhas quanto cascas, frutos e raízes; destacando-se os flavonoides, esteroides, hidroxiamidas, alcanos e ácidos graxos, cumarinas, peptídeos, carboidratos, carbamatos e alquilaminas, carotenoides, compostos voláteis, além de potássio, magnésio, cálcio e sódio (HERNANDEZ, 2016).

Geraci (2016) avaliou, qualitativamente e quantitativamente, a composição química do óleo essencial de *Citrus sinensis* empregando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Como resultado, obteve-se que o principal componente entre os 54 identificados foi o D-limoneno (73,9% - 97%). O óleo apresentou também porcentagens variadas de linalol, geraniol e nerol.

As ações antioxidante e antiinflamatória da *Citrus sinensis* provavelmente são decorrentes da presença dos componentes fenólicos e flavonoides, os quais inibem o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  (GERACI, 2016, SOMMELLA, 2017). Em estudo conduzido por Liew (2018), os extratos obtidos da casca de *C. sinensis* também apresentaram grandiosa atividade antioxidante.



O extrato metanólico e a fração acetato de etila obtidos da casca do fruto de *Citrus sinensis* apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis* com CIM de 400 µg/mL e 260 µg/mL, respectivamente, e em relação à *Candida albicans*, a CIM foi >1000 µg/mL independentemente do solvente empregado (SALEEM, 2020).

A espécie vegetal *C. sinensis* apresenta atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* (HERNANDEZ, 2016), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* (LI, 2017), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens* e *Pseudomonas aeruginosa* (GERACI, 2016).

Fisher e Phillips (2009) analisou uma mistura na proporção igualitária de óleo essencial de *C. sinensis* e *C. bergamia* e encontrou a dose de inibição mínima contra *E. faecalis* foi de 50 mg/L.

A planta apresentou atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonenses* e observa-se que a citotoxicidade, avaliada em macrófagos RAW 264,7 e J774.G8, foi semelhante à da anfotericina B (GARCIA, 2017).

### **2.7.6 *Citrus grandis***

Conhecido popularmente como pomelo (CHEN, 2018), amplamente utilizado na culinária tanto como comida, quanto bebida (FRASSINETTI, 2011). A casca de sua fruta é amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de diversas patologias (HAN, 2014). Segundo Chen (2020), as cascas da fruta apresentam maior capacidade antioxidante quando comparada ao fruto e ao suco de *C. grandis*. Conforme estudo conduzido por Kumar e colaboradores (2019) o suco de pomelo apresenta potencial antioxidante.

O óleo essencial extraído da casca de *Citrus grandis* apresenta diversos compostos químicos sendo 87,5% o composto fitoquímico limoneno, 3,1% mirceno, 2,7% β-pineno, 6,0% α-pineno, 0,6% de óxido de cis-linalol e 0,4% linalol (CHEN, 2018). No experimento conduzido por Elalfi (2018), na concentração de 1 µg/mL, o óleo inibiu em cerca de 35% o biofilme de *C. albicans*.

Kuo (2017) também destaca a presença de cumarinas, flavonóides, triterpenóides, bezenóides, esteróides, lignana e amida no extrato etanólico das cascas de *Citrus grandis* e sua notável ação antiinflamatória. As cumarinas presentes

nessa planta reduziram os níveis de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), demonstrando, portanto, atividade hepatoprotetora (TIAN, 2019).

No ensaio de citotoxicidade com células de fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) na concentração de 250 µg/mL, o óleo de suas cascas foi considerado citotóxico (ELALFI, 2018).

### **2.7.7 *Citrus medica limonum***

Conhecido popularmente como limão-galego, apresenta-se como um arbusto de até 2 metros de altura, com espinhos no caule (CAMPBELLO, 2013). Esta espécie vegetal é rica em vitaminas C e A, niacina e tiamina. Os componentes presentes em suas folhas exibem efeito sedativo e antiespasmódico, além das mesmas (folhas) serem empregadas para combater a insônia e o nervosismo (ONYEYIRICHI, 2014). Também é amplamente utilizado para o tratamento de problemas respiratórios, tosses, gripe e dor de garganta, além de manifestar ação antialérgica (CAMPBELLO, 2013).

A análise do óleo essencial adquirido comercialmente e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), revelou a presença de: limoneno (50,3%),  $\beta$ -pineno (14,4%) e  $\gamma$ -terpineno (11,7%) (VINTURELLI, 2017). Porém, no estudo conduzido por Lou (2017), foram encontrados: limoneno (50,04%), terpineno (32,11%),  $\alpha$ -pineno (2,75%) e 1,3,6-octatrieno, 3,7-dimetil-, (Z)- (1,64%). Como principais componentes, o óleo essencial obtido de suas folhas extraído por hidrodestilação e analisado por CG-EM identificou citronelal (29,31%), limoneno (17,59%), citral (12,71%), 1,6-octadieno-3-ol, 3,7-dimetil (10,91%), segundo Onyeyirichi (2014).

Outros autores também ressaltam as atividades biológicas do óleo essencial dessa planta: antioxidante e antibacteriana contra *S. aureus* (LOU, 2017), bem como a atividade repelente (FRANÇA, 2012).

### 2.7.8 *Citrus aurantium dulcis*

Popularmente conhecido como laranja doce, seu fruto é amplamente utilizado na produção de sucos, gerando subprodutos industriais com propriedades bioativas, como as cascas que se podem extrair os óleos essenciais (ARAUJO, 2020).

Os componentes químicos verificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da *Citrus aurantium dulcis* foram: limoneno (96,25%), mirceno (1,81%), linalol (0,49%),  $\alpha$ -pineno (0,49%), sabineno (0,32%),  $\beta$ -felandreno (0,27%) (ANDRADE, 2014).

Microesferas de óleos essenciais de *Citrus aurantium dulcis* apresentam atividade antioxidante e antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* (ARAUJO, 2020).

### 2.7.9 *Citrus reticulata*

Popularmente conhecida como pokan, tangerina ou mandarina. O óleo essencial extraído da casca do fruto apresentou predominantemente as substâncias químicas: limoneno (26,5%),  $\gamma$ -terpineno (17,2%), linalol (11,1%), octanal (8,0%), mirceno (6,2%) e capraldeído (3,9%) (CHEN, 2020).

Chen (2020) avaliou a capacidade antioxidante da casca, do fruto e do suco da *C. reticulata*, utilizando o método de sequestro de espécies reativas, através da redução do DPPH, encontrando a casca do fruto com maior atividade antioxidante frente às 27 espécies de *Citrus* testadas.

Nos ensaios de citotoxicidade em células de fibroblastos saudáveis, oriundos de pulmão humano (GM07492-A), observou-se que o óleo essencial da casca do fruto de *C. reticulata* nas concentrações  $\geq 1250$   $\mu\text{g/mL}$  reduziram significativamente a viabilidade celular (MARTINS, 2017).

Observando os ensaios de citotoxicidade de Elalfi (2018) em linhagens celulares de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), a concentração letal do óleo essencial de *C. reticulata* foi de 300  $\mu\text{g/mL}$ . Com relação à *C. albicans*, a concentração do óleo essencial de *Citrus reticulata* para inibir 50% do crescimento do biofilme foi de 0,90 mg/mL.

## 2.8 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 2.8.1 Métodos alternativos ao uso de animais

A utilização de animais, em ciências, é reportada desde a Grécia antiga. No século XIX, iniciou-se um aumento na utilização de seres vivos devido à ascensão da pesquisa científica (GUIMARÃES, 2016). Em 1959, William Russel e Rex Burch publicaram o livro *Principles of Human Experimental Technique* dando início ao movimento de proteção animal na avaliação de toxicidade e estabelecendo, na pesquisa, o princípio dos 3Rs: *Reduction*, reduzir o número de animais através de planejamento experimental; *Refinement*, diminuir o sofrimento, estresse e dor dos animais e *Replacement*, substituir o uso de animais vertebrados vivos por uma metodologia *in vitro* ou modelos computacionais sem a utilização de animais.

Nas décadas seguintes, esforços foram feitos para estimular, desenvolver e validar métodos alternativos que utilizam células, tecidos, bactérias, fungos e frações de sistemas biológicos em detrimento à utilização animal (BEDNARCZUK, 2010).

No Brasil, em 2008, foi idealizado o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (PRESGRAVE, 2008) recebendo apoio da comunidade científica e órgãos internacionais (ESKES, 2009; PRESGRAVE, 2010). A criação do centro se deu em 2013, resultado da cooperação técnica entre a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Atualmente a maioria da população brasileira é favorável a utilização de animais em pesquisas, principalmente para fins médicos, porém a opinião dos brasileiros ainda está dividida em relação ao uso animal em pesquisa e ensino científico. Nesse sentido, há a necessidade de uma melhor comunicação entre a comunidade científica e a população em geral sobre os benefícios e prejuízos dessa técnica (ANDERSEN, 2020).

Em 03 de julho de 2012, através da portaria do Ministério Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) nº 491, o ministro cria a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais – RENAMA, que visa promover a implementação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de animais; promover a adoção de métodos alternativos ao uso de animais nas atividades de ensino e pesquisa; estimular a implantação de métodos alternativos ao uso de animais por meio de treinamento técnico e implementação de metodologias validadas; monitorar

periodicamente o desempenho dos laboratórios associados por meio de comparações interlaboratoriais; promover a qualidade dos ensaios usando-se do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável; incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); disseminar o conhecimento na temática de métodos alternativos ao uso de animais; ofertar, no âmbito dos laboratórios integrantes da rede, serviços para ensaios toxicológicos utilizando metodologias alternativas ao uso de animais (BRASIL, 2012).

Em seguida em 19 de maio de 2021 através da resolução normativa nº 53, de 19 de maio de 2021, defende as restrições ao uso de animais em ensino, em complemento à Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (BRASIL, 2021).

#### 2.8.1.1 Cultura de células

A cultura de células é um método alternativo ao uso de animais na pesquisa científica. Consiste no cultivo de células em meio de cultura, com fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento. Variáveis como assepsia, umidade, temperatura, conhecimento técnico científico influenciam no cultivo celular (RAJARAM, 2020; ZHANG, 2020).

Entre suas vantagens, pode-se destacar: preservação (capacidade de armazenar as células em sistemas de congelamento como o nitrogênio líquido), credibilidade, replicação, economia dos reagentes, melhor controle do microambiente, entre outros (ASSIS, 2007).

Atualmente, o estudo em cultura de células é ferramenta essencial nos campos da saúde, possui inúmeras aplicações como método *in vitro* de avaliação da citotoxicidade de substâncias de interesse (CAMPANER, 2020; GAUDIN, 2020, SELENIUS, 2019).

#### 2.8.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Substâncias utilizadas na saúde de seres vivos devem passar por avaliação de citotoxicidade, na qual será mensurada a replicação, crescimento e a morfologia da célula, ou seja, a viabilidade celular (LIU, 2018).

A citotoxicidade pode ser avaliada por métodos colorimétricos, como o ensaio de redução do brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT), no qual as células metabolicamente viáveis apresentam desidrogenases mitocondriais clivadoras do anel tetrazólio, alterando o espectro colorimétrico do amarelo ao azul, devido ao produto da reação – formazana. De acordo com alguns autores (ALESSANDRO, 2018; GRELA, 2018; KUMAR, 2018), este ensaio colorimétrico é considerado padrão-ouro para avaliação da viabilidade e proliferação celular.

### **2.8.3 Atividade antioxidante**

Espécies reativas são produzidos diariamente no organismo humano e são fundamentais para a homeostase celular e o funcionamento adequado dos organismos vivos (MARTELLI, 2014). São moléculas ou átomos instáveis que apresentam número ímpar em sua camada de valência. São formados em reações oxi-redutoras (RAKHIT, 2013) podendo ser espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de oxigênio (EROs). AS EROs podem ser divididas em dois grupos: os radicais (hidroxila, superóxido, peroxila e alcoxila) e os não radicalares (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso) (MARTELLI, 2014, BARREIROS, 2006).

Apresentam papel essencial na homeostase, com produção na cadeia respiratória mitocondrial e regulação no sistema de defesa antioxidante celular (MARTELLI, 2014).

Quando o sistema de defesa antioxidante não consegue metabolizar as EROs e ERNs, tem-se o estresse oxidativo (SOUSA, 2020). As espécies reativas, quando em maiores quantidades, são prejudiciais ao organismo e partícipes da etiologia e fisiopatologia de diversas doenças (XU, 2019).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Entre os enzimáticos temos: glutathiona (GSH), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx) (BENKHALIFA, 2014, RHEDER, 2018). E os não enzimáticos, as vitaminas C e E, o resveratrol, o selênio, entre outros (TREMELLEN, 2008, WELCH, 2020).

### 2.8.3.1 Método de sequestro de espécies reativas pelo 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O DPPH é um composto altamente reativo que simula a espécie reativa do oxigênio ou nitrogênio. O método se baseia na capacidade da substância testada em reduzir o DPPH formando a hidrazina. Quanto maior a capacidade antioxidante da substância, maior será a formação da hidrazina. Inicialmente, o DPPH apresenta-se com coloração violeta que modificará a cor para amarelo pálido ao ser reduzido. O nível de absorvância da substância é medido através do espectrofotômetro. Quanto maior a capacidade antioxidante, menor a absorvância (ALVES, 2010, OLIVEIRA, 2015). Este método é considerado fácil, preciso, rápido, simples e econômico, sendo adequado para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras e misturas (OLIVEIRA, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a efetividade e a segurança de 10 óleos essenciais pertencentes ao gênero *Citrus* como alternativa aos solventes endodônticos convencionais.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil químico dos óleos essenciais do gênero *Citrus* de interesse: *Citrus aurantium var. amara*, *Citrus deliciosa*, *Citrus limonia*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus medica limonum*, *Citrus aurantium dulcis* e *Citrus reticulata*.
- Avaliar a desintegração e a dureza dos cones de guta percha pós-exposição às substâncias-teste.
- Analisar a superfície dos cones de guta percha pós-exposição às substâncias-teste.
- Estimar os potenciais biológicos (atividades antimicrobiana frente aos microrganismos: *Candida albicans* ATCC 10231 e *Enterococcus faecalis* - ATCC 51299 e antioxidante) dos óleos essenciais.
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos óleos essenciais empregando fibroblastos murinos (L929).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

Neste estudo comparativo laboratorial foram avaliadas a capacidade solvente e atividade biológica de 13 substâncias, sendo 10 óleos essenciais do gênero *Citrus* e 3 controles, adquiridos comercialmente, conforme Quadro 1.

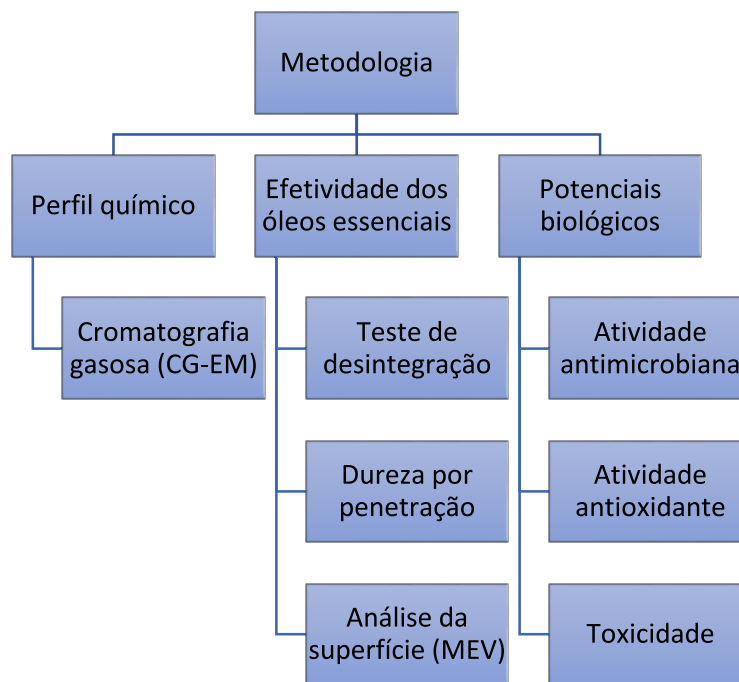
Quadro 1: Informações sobre as substâncias-teste avaliadas neste estudo.

<b>Código</b>	<b>Substância</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Fabricante</b>
Óleo 1	<i>Citrus aurantium</i> <i>var. amara</i>	Laranja amarga Laranja da terra	Casca	Grupo Laszlo
Óleo 2	<i>Citrus deliciosa</i>	Petitgrain Madarina	Folha	Grupo Laszlo
Óleo 3	<i>Citrus limonia</i>	Petitgrain Limão Capeta (CRAVO)	Folha	Grupo Laszlo
Óleo 4	<i>Citrus sinensis</i>	Laranja Valência Laranja Doce	Casca	Grupo Laszlo
Óleo 5	<i>Citrus grandis</i>	Grapefruit	Casca	WNF*
Óleo 6	<i>Citrus medica limonum</i>	Limão Siciliano	Casca	WNF*
Óleo 7	<i>Citrus aurantium dulcis</i>	Laranja doce	Casca	WNF*
Óleo 8	<i>Citrus reticulata</i>	Tangerina var. "POKAN"	Casca	Grupo Laszlo
Óleo 9	<i>Citrus sinensis</i>	Laranja Doce Var. "PERA"	Casca	Grupo Laszlo
Óleo 10	<i>Citrus sinensis</i>	Laranja-lima "Laranja doce"	Casca	Grupo Laszlo
Controle 1 (C1)	Eucaliptol®	NA	NA	Biodinâmica
Controle 2 (C2)	Endosolv®E	NA	NA	Septodont
Controle 3 (C3)	Clorofórmio	NA	NA	Synth

\* WNF Indústria e Comercio Ltda, NA = não se aplica. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As amostras foram submetidas às análises laboratoriais, conforme Esquema 1. O perfil químico dos óleos essenciais foi avaliado por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM); a efetividade dos óleos essenciais na remoção da guta percha, por meio dos testes de desintegração; dureza por penetração e análise da superfície da guta percha, através de microscopia eletrônica de varredura. Com relação aos potenciais biológicos foi avaliado a atividade antimicrobiana por meio da análise turbidimétrica contra *E. faecalis* e *C. albicans* e a atividade antioxidante pelo do método de sequestro de espécies reativas de oxigênio. A toxicidade aguda foi avaliada pelo ensaio com 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) empregando fibroblastos murinos (L929).

Esquema 1: Testes laboratoriais realizados:



## 4.2 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Considerando a necessidade de análise e de caracterização da composição química de cada óleo essencial, optou-se pelo método de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi utilizado o sistema analítico composto por cromatógrafo QP2010 Ultra com amostrador automático AOC -5000 Plus (Shimadzu) e uma coluna cromatográfica de 30 metros (SH-Rtx-5MS Shimadzu).

Para o preparo das amostras, 20  $\mu\text{L}$  do óleo essencial ou padrão foram adicionados a 980  $\mu\text{L}$  de acetato de etila grau HPLC (do inglês *High performance liquid chromatography*) em frascos próprios para o injetor. Foi utilizado padrão de hidrocarbonetos C7-C30 (Sigma-Aldrich).

As condições cromatográficas de análise foram: temperatura do forno 60°C, temperatura do injetor 220°C, gradiente linear 60 - 240°C com variação de 3°C/minuto, fluxo do gás de arraste de 8,5 mL/minuto, injeção de 1  $\mu\text{L}$  e *split* de 1:5. As condições analíticas foram: temperatura da fonte 290°C e da interface 280°C, ganho do detector de 1,05 kV e varredura de 20 a 500 m/z.

Os dados obtidos foram analisados comparando o perfil de fragmentação da molécula no espectro de massas, com os dados depositados na biblioteca NIST e a similaridade calculada pelo *software* GC-MS *Postrun Analysis*. Padrões de fragmentação também foram comparados aos padrões da literatura internacional - o ADAMS (2007).

Foram utilizados o cálculo do índice de Kovatz e o índice de retenção com programação linear de temperatura e, posteriormente, comparados com a literatura.

O índice de Kovatz foi calculado conforme expressão matemática (Equação 1), onde  $t'_R$  é o tempo de retenção ajustado (tempo de retenção do pico menos o tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna cromatográfica),  $i$  é o analito,  $n$  – número de carbonos do padrão adjacente menos retido e  $n + 1$  é o número de carbonos do padrão adjacente mais retido (MUHLN, 2009).

$$KI = 100n + 100 \left( \frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right)$$

(Equação 1)

O cálculo do índice de retenção com programação linear de temperatura (*Linear Temperature Programmed Retention Indexes*, LTPRI) foi obtido conforme expressão matemática abaixo (Equação 2).

$$\text{LTPRI} = 100n + 100 \frac{t'_{R(i)} - t'_{R(n)}}{t'_{R(n+1)} - t'_{R(n)}}$$

(Equação 2)

### 4.3 TESTE DE DESINTEGRAÇÃO

A desintegração é o ato de desintegrar-se, separando-se de um todo, resultando na liberação de partículas do corpo de prova que ficam em suspensão no solvente tornando-se turvo (ESTRELA, 2005).

A amostra total foi composta por 234 cones de guta percha (tamanho M, com 28 mm de comprimento, marca Meta biomed, importado por GN INJECTA IND E COM LTDA, lote: GE17070735). Cada amostra foi composta de 3 cones de guta percha, para cada óleo testado, sendo o teste realizado em triplicata.

Conforme metodologia modificada de Ramos, Camara e Aguiar (2016), os cones de guta percha inicialmente foram pesados em uma balança analítica de 4 casas decimais. Em seguida, foram colocados em um tubo de vidro cilíndrico (37 mm de altura e 10 mm de diâmetro) ficando imersos em 2 mL das substâncias-teste. Metade da amostra ficou submergida por um tempo de 5 minutos e a outra por 15 minutos.

Posteriormente, os cones foram lavados com água destilada (100 mL), com auxílio de seringa, cujo conteúdo foi dispensado em jatos contínuos (5 vezes de 20 mL). Em seguida, os cones foram secos em temperatura ambiente por 72 horas, em peneiras granulométricas de aço inox (tamis), com a finalidade de que não ocorresse acúmulo de água e não houvesse interação com a substância testada.

Após a secagem, os cones de guta percha foram pesados novamente para avaliar a perda de massa. A massa perdida ( $M_p$ ) foi calculada pela massa inicial ( $M_i$ ) dos cones menos a massa final ( $M_f$ ), sendo dada pela Equação 3 (RAMOS, 2016).

$$M_p = M_i - M_f$$

(Equação 3)

### 4.4 ENSAIO DE DUREZA

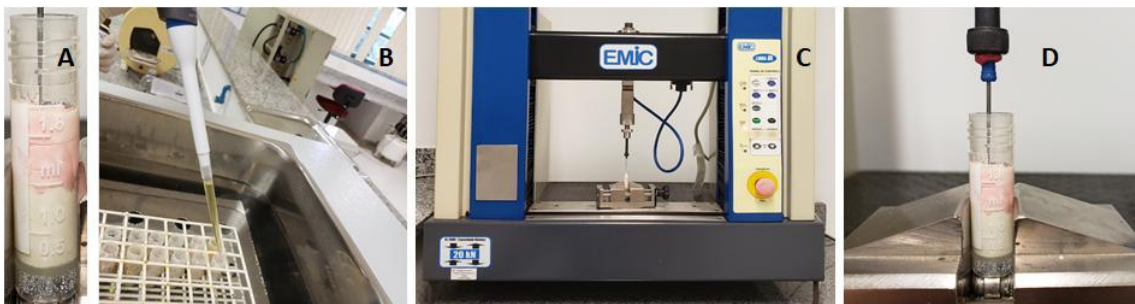
Inicialmente, foram confeccionados 52 corpos de prova, divididos em 13 grupos distintos, cada qual contendo 4 espécimes. Conforme metodologia realizada por Jantarát, Malhotra e Sutimuntanakul (2013), confeccionou-se um tubo cilíndrico de 33 mm de altura com 10 mm de diâmetro, o qual foi dividido em três partes iguais (Figura 2A) de 10 mm. Na porção inferior foi colocado restaurador temporário Obtur (marca: Maquira, lote: 398917). Em seguida, foram acrescentados 10 mm de guta percha

bastão (Odahcam, marca: Dentsply sirona, lote: 360770L), plastificada através de uma seringa metálica em alta temperatura.

Os corpos de prova foram submetidos ao banho-maria por 1 hora na temperatura de 37 °C, simulando o ambiente oral. Posteriormente, foram adicionados 0,1 mL da substância-teste na porção superior do corpo de prova, com tempo de atuação de cinco minutos e mantidos em banho-maria (Figura 2B).

Após esta etapa, foi realizado o teste de força de compressão com auxílio da máquina de ensaio universal (EMIC, fabricante: Instron) (Figura 2C). Foi calculada a força máxima, aplicada perpendicularmente ao plano do corpo de prova, com velocidade igual a 5 mm/minuto, necessária para que ocorresse o deslocamento de um espaçador C endodôntico por 5 mm através da guta percha (Figura 2D).

Figura 2 – Etapas do ensaio de dureza por penetração.



A = porção inferior com obtur com 10 mm seguido de 10mm de guta percha, B = 0,1mL de substância-teste acima da guta percha , C = o teste sendo realizado na EMIC e D= perfuração do corpo de prova sendo realizado com o espaçador. Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O programa utilizado para a análise da EMIC foi o *Test Script* (TESC) que definiu o procedimento de ensaio, desde a sequência de aplicação de cargas até a análise dos resultados e emissão do relatório.

#### 4.5 ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DOS CONES DE GUTA PERCHA

Conforme metodologia modificada de Vitali (2015), a fim de avaliar as alterações superficiais do cone de guta percha, foram selecionados 13 cones de guta percha (tamanho M, com 28 mm de comprimento, marca Meta biomed, importado por GN INJECTA IND E COM LTDA, lote: GE17070735). Os mesmos foram colocados em um tubo de vidro cilíndrico e a eles foram adicionados 2 mL das substâncias-teste, ficando submersos por 5 minutos.

Posteriormente, os cones foram lavados com água destilada (100 mL), com auxílio de uma seringa de 20 mL. Em seguida, os cones foram secos em temperatura ambiente por 72 horas, em uma placa de vidro lisa.

Após a secagem, foi padronizada a região apical do cone para a análise, sendo seccionada e fixada em base cilíndrica de metal (*stubs*). A porção apical foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de bancada (TM3000, Hitachi), operando de 5 KV e 15 KV modo EDX. As eletromicrografias foram realizadas e as imagens capturadas empregando aumentos de 50, 500 e 1000 vezes para a análise topográfica.

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O ensaio laboratorial seguiu padrões de qualidade em pesquisa microbiológica, sendo realizados procedimentos rígidos de esterilização e manutenção da cadeia asséptica (NCCLS, 2003).

O material microbiológico foi proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC). As cepas utilizadas foram *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299).

O teste de atividade antimicrobiano sucedeu-se através da técnica de microdiluição com determinação de concentração inibitória mínima (CIM) por meio da análise turbidimétrica.

Preparou-se uma suspensão microbiana com soro fisiológico estéril (cloreto de sódio 0,9%), com 25% de transmitância, para o *E. faecalis*, e 10 % de transmitância para a *C. albicans*, medidas com o emprego do espectrofotômetro. Após a padronização, realizou-se a diluição seriada com soro fisiológico estéril.

Posteriormente, realizou-se a incubação da suspensão microbiana, em duplicata em placas de Petri, nas diluições de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  por período de 24 horas para *E. faecalis*, em meio de cultivo *Tryptone Soy Agar* (TSA) e diluições de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ , por 48 horas para *C. albicans*, em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), visando à contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) para preparo da solução padronizada na concentração de  $3 \times 10^3$  UFC/mL em meio *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) estéril para *E. faecalis* e *Meio do Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI) para *C. albicans*.

Em placa de 96 poços, de fundo chato e estéril, foram adicionados 100 µL do inóculo e 100 µL das substâncias-teste (óleos e controles: eucaliptol, endosolv®E, clorofórmio) em diferentes concentrações (1,9 µg/mL a 1000 µg/mL).

O antibiótico empregado como referência para as cepas do *E. faecalis* foi o cloranfenicol (nas concentrações de 250 µg/mL a 1,95 µg/mL. O antifúngico empregado como referência para as cepas de *C. albicans* foi a nistatina, em diluições seriadas nas concentrações de 64 UI a 0,125 UI.

Como controle negativo foram utilizados os meios de cultura BHI e RPMI em triplicata, sem inóculo microbiano, respectivamente para *E. faecalis* e *C. albicans*. E como controles positivos, foram empregados os inóculos sem adição de substâncias-teste, também em triplicata. As placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas para *E. faecalis* e 48 horas para *C. albicans* em ambiente aeróbico.

A CIM é a menor concentração que não apresentou crescimento microbiano, este detectado pela turvação do meio. Com objetivo de diferenciar a atividade antimicrobiana em bactericida ou bacteriostática e entre fungicida ou fungistática, foram pipetados 20 µL do conteúdo do poço que não apresentou turvação em 4 mL de meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) para *E. faecalis* e 5 µL de cada poço para 1 mL de meio *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) para *C. albicans*. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata (CANDAN, 2003).

No teste com o *E. faecalis* como houve turvação em todos os poços para os óleos testados, ou seja, houve proliferação microbiana em todas as concentrações testadas, optou-se por realizar a leitura em espectrofotômetro no leitor de placa para determinar a porcentagem de crescimento (ou inibição) na presença das substâncias testadas.

#### 4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro de espécies reativas de oxigênio, através da redução do DPPH, conforme metodologia proposta por Sreejayan e Rao (1996), com algumas modificações. Iniciou-se com o preparo da solução de DPPH na concentração de 0,05 mM. Em um balão volumétrico, foram transferidos 1 mg de DPPH e 50 mL de etanol absoluto, em seguida, o balão foi mantido em banho de ultrassom por 2 minutos.

As amostras dos óleos testados foram preparadas a partir de 10 µL de óleo e 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), solubilizados em 1980 µL de etanol para análise (PA) obtendo uma solução inicial de 5000 µg/mL. Dessa, foram alíquotados 200 µL aos quais se adicionou 800 µL de etanol PA, obtendo uma solução com concentração de 1000 µg/mL. Foram realizadas diluições seriadas utilizando o etanol PA como diluente. Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 50 µL da amostra, em diferentes concentrações, e 150 µL de DPPH. Ao término do processo, foram obtidas concentrações-teste na faixa de 0,122 a 250 µg/mL. As placas foram levadas para homogeneização no agitador de microplaca por 3 minutos, e mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse tempo, foi realizada a leitura da placa com o espectrofotômetro (Multiskan GO, Datamed, Brasil) no comprimento de onda fixo de 510 nm. A fim de excluir possíveis interferências da coloração da amostra, um branco foi preparado a partir de 150 µL de etanol absoluto que foi adicionado a 50 µL da solução-teste. O padrão de referência utilizado no ensaio foi o ácido ascórbico (DUARTE-ALMEIDA, 2006). O ensaio foi realizado em triplicata.

A atividade antioxidante foi calculada por meio da Equação 4.

$$Atividade\ antioxidante\ (\%) = \frac{A_{amostra} - A_{controle}}{ADPPH} \times 100$$

(Equação 4)

na qual,  $A_{amostra}$  representa o valor da absorbância para a solução que contém a amostra mais o DPPH;  $A_{controle}$  é referente ao valor de absorbância da amostra mais o etanol PA; e  $ADPPH$  representa a absorbância da solução de DPPH.

## 4.8 CITOTOXICIDADE

### 4.8.1 Linhagem celular

Empregou-se para o ensaio de citotoxicidade a linhagem celular de fibroblasto murino (L929) cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma Aldrich), 1% de penicilina e estreptomicina (100 µg/mL, Sigma-Aldrich) e tampão 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico (HEPES, 10mM - Sigma-Aldrich) sob condições controladas de temperatura 37 °C, pH=7,2, em incubadora de CO<sub>2</sub> à 5%.



#### 4.8.2 Preparo das substâncias-teste

Com relação a cada óleo testado, foi preparada uma solução-estoque composta de 10 µL de óleo, 10 µL de DMSO, 1980 µL de meio de cultura suplementado, conforme descrito acima. Em seguida, realizou-se a segunda solução composta por 400 µL da primeira solução acrescida de 1600 µL de meio suplementado, obtendo-se uma concentração de 0,1% de óleo (1000 µg/mL), ou seja, a maior concentração testada. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas, de modo a obter concentrações de 7,81 a 1000 µg/mL.

#### 4.8.3 Viabilidade celular

Este estudo se baseou na metodologia de Mosmann (1983), a qual emprega o ensaio com MTT para a análise da viabilidade celular. Para esta tese foram empregadas células de fibroblastos murinos (L929). Em cada poço da placa de 96 poços, foram plaqueados 100 µL de meio de cultivo supracitado (item 4.8.1), equivalendo a uma densidade celular de  $5 \times 10^3$  células por poço, incubando-as por 24 horas (período suficiente para que ocorresse a adesão da célula na placa). Em seguida, o meio suplementado foi retirado e 100 µL das substâncias-teste foram pipetadas em cada poço. O ensaio foi realizado em quintuplicata. Realizaram-se dois controles: o primeiro foi preparado com 10 µL de DMSO e 1990 µL de meio suplementado (avalia o efeito do solvente sobre a célula), já o segundo apenas com o meio suplementado (avalia o efeito do meio de cultivo).

As placas foram levadas à estufa na temperatura de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Posteriormente, os tratamentos foram removidos, os poços lavados com 100 µL de tampão fosfato-salino – PBS (*phosphate buffered saline*), em seguida colocados 100 µL de MTT a 10% (10 µL de MTT e 90 µL de DMEM). As placas foram incubadas por 3 horas, a *posteriori* foi retirado o MTT, acrescidos 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazana. A absorvância foi medida com auxílio de espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de viabilidade celular por meio da Equação 5.

$$Viabilidade\ celular(\%) = \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100$$

(Equação 5)

onde,  $A_{amostra}$  é o valor da absorvância obtida após a reação com MTT referente às células tratadas com diferentes concentrações de óleo;  $A_{controle}$  é referente ao valor de absorvância após reação com MTT de células não tratadas.

Subsequentemente, realizou-se a análise estatística com auxílio do programa Graphpad Prism, versão 5.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Na Tabela 1 encontram-se os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais analisados por CG-EM e a comparação ao descrito nas normas ISO (do inglês, *International Organization for Standardization*). Picos com valores menores que 1% não foram computados para o perfil dos óleos essenciais. Vale ressaltar que para os óleos 2, 3 e 5 não foram encontrados registros na Farmacopeia Europeia e nem nas normas ISO.

Tabela 1: Perfil fitoquímico dos óleos essenciais obtidos por CG-EM e aqueles encontrados nas normas ISO correspondentes.

Amostra	Componente	ISO (mín a máx)		No ensaio
Óleo 1 <i>Citrus aurantium</i> <i>var. amara</i>	$\alpha$ -Pinoeno	Tunísia e Marrocos	Egito	1,81
		até 2,0	até a 2,0	
	$\beta$ -Pinoeno	5,0 a 17,0	2,0 a 8,0	1,49
	$\beta$ -Mirceno	1,0 a 4,0	1,0 a 4,0	4,92
	D-Limoneno	9,0 a 18,0	7,0 a 17,0	81,71
Óleo 4 <i>Citrus sinensis</i>	$\alpha$ -Pinoeno	0,4 a 0,8		1,5
	$\beta$ -Mirceno	1,5 a 3,5		4,64
	D-Limoneno	93,0 a 96,0		73,41
	n- Decanal	0,1 a 0,7		1,71
	Linalol	0,15 a 0,7		1,93
Óleo 6 <i>Citrus medica limonum</i>	$\alpha$ -Pinoeno	1,5 a 2,5		3,74
	Sabineno	1,5 a 2,5		4,15
	$\beta$ -Pinoeno	9,0 a 14,0		12,33
	D-Limoneno	63,0 a 70,0		52,03
	$\gamma$ - terpineno	8,3 a 9,5		11,05

<i>continuação</i>				
<b>Amostra</b>	<b>Componente</b>	<b>ISO (mín a máx)</b>		<b>No ensaio</b>
Óleo 7 <i>Citrus aurantium dulcis</i>	α-Pineno	Tunísia e Marrocos	Egito	2,16
		- a 2,0	- a 2,0	
	Sabineno	- a 3,0	- a 3,0	1,52
	β-Pineno	5,0 a 17,0	2,0 a 8,0	4,10
	β-Mirceno	1,0 a 4,0	1,0 a 4,0	4,65
	D-Limoneno	9,0 a 18,0	7,0 a 17,0	74,44
Óleo 8 <i>Citrus reticulata</i>	α-Pineno	1,6 a 2,7		1,81
	β-Pineno	1,0 a 2,0		1,68
	Mirceno	1,4 a 2,0		3,94
	γ- terpineno	16,0 a 22,0		6,93
	D-Limoneno	65,0 a 75,0		72,53
Óleo 9 <i>Citrus sinensis</i>	α-Pineno	0,4 a 0,8		1,81
	β-Pineno	0,02 a 0,15		1,07
	Sabineno	0,2 a 1,0		1,09
	β-Mirceno	1,5 a 3,5		4,60
	D-Limoneno	93,0 a 96,0		81,39
	<i>Linalol</i>	0,15 a 0,7		1,44
Óleo 10 <i>Citrus sinensis</i>	β-Pineno	0,02 a 0,15		4,45
	β-Mirceno	1,5 a 3,5		3,35
	D-Limoneno	93,0 a 96,0		67,66

CG-EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

ISO = *International Organization for Standardization*

ISO 3517 (*Citrus aurantium*), 855 (*Citrus medica limonum*), 3140 (*Citrus sinensis*) e 3528 (*Citrus reticulata*).

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para os óleos 1 e 7 (*Citrus aurantium var.amara*, *Citrus aurantium dulcis*, respectivamente), ambos extraídos da casca da laranja, utilizou-se a ISO 3517 referente ao óleo essencial, extraído das flores secas da *Citrus aurantium* cultivadas na Tunísia, Marrocos e Egito, visto que não há ISO específica para óleos extraídos da

casca da fruta de plantas brasileiras. A diferença expressiva na concentração do composto D-limoneno do experimento (81,71% e 74,44%, respectivamente para os óleos 1 e 7) se deve ao fato da extração ser da casca, enquanto na ISO 3517 o valor de D-limoneno é expressivamente menor, devido ao óleo ter sido extraído das flores secas, ou seja, a matriz de obtenção dos óleos é distinta. No entanto, o percentual de D-limoneno encontrado aqui é concordante com o demonstrado por Sarrou (2013) (94,67%) que também utilizou a casca da fruta.

Para a análise dos óleos 4, 9 e 10 extraídos da casca da laranja *Citrus sinensis*, recorreu-se a ISO 3140. Para o óleo 6, a referência foi a ISO 855 relativa ao óleo extraído da casca do limoeiro *Citrus limon* tipo americano. No caso do óleo 8 foi usado como modelo para comparação a ISO 3528, redigida para o óleo essencial da casca do limoeiro *Citrus limon yellow*.

De acordo com Martins (2011), as plantas do gênero *Citrus* exibem uma variabilidade química intra-específica (polimorfismo químico), devido aos fatores ambientais extrínsecos à biologia vegetal, outros dependentes da fisiologia das plantas, como do genoma, o tipo de órgão e os quimiotipos, resultando em óleos essenciais com composições muito distintas no mesmo *taxon*. Esta variabilidade pode ser notada também nas amostras aqui analisadas (Tabela 2), na qual também podem ser visualizados o índice de retenção linear obtido no experimento e o valor encontrado na literatura. Destaque em vermelho para a predominância do composto D-limoneno (47,66% a 82,10%) nos óleos avaliados.

Tabela 2: Constituintes químicos dos óleos essenciais de interesse.

Substâncias	LRI <sub>exp.</sub>	LRI <sub>lit.</sub>	Concentração da substância em cada óleo essencial									
			O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10
α-pineno	936	932	1,81	2,25	2,57	1,5	1,58	3,74	2,16	2,22	1,81	
Sabineno	977	969			3,13			4,15	1,52		1,09	
β-pineno	981	974	1,49	3,99	6,35		1,53	12,33	4,1	1,68	1,07	4,45
β-mirceno	995	988	4,92	2,49	3,48	4,64	4,92	3,24	4,65	3,94	4,6	3,35
D-limoneno	1041	1024	81,71	47,66	64,8	73,41	82,1	52,03	74,44	72,53	81,39	67,66
γ-terpineno	1063	1054		10,96	3,06			11,05	4,82	6,93		
Linalol	1110	1095				1,93					1,44	
Óxido de limoneno (cis)	1146	1132										2,17
Óxido de limoneno	1145	1137							1,63			
Óxido de limoneno (trans)	1150	1137										2,16
α-terpineol	1205	1205				1,27						2,08
N-decanal	1214	1201				1,71						
Acetato de linalila	1265	1254					1,49					
N-metil antranilato de metila	1427	1405		18,22								

LRI<sub>exp.</sub>: índice de retenção do experimento, LRI<sub>lit.</sub>: índice aritmético encontrado na literatura (Adams, 2007).

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O composto químico D-limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico (JIANG, 2011), apresentou índice de similaridade de 94,00%. Componente majoritário em todos os óleos analisados, variando de 47,66% no óleo essencial das folhas de *Citrus deliciosa* (petitgrain madarina) a 82,10% no óleo essencial da casca do *Citrus grandis* (grapefruit). O D-limoneno foi encontrado por diversos autores: nos óleos essenciais obtidos de *Citrus aurantium var. amara* (ADAMS, 2007; SARROU, 2013; SHEN, 2007, YANG 2017), de *Citrus deliciosa* (ADAMS, 2007; DUGO, 2010; FRIZZO, 2004 MINTEGUIAGA, 2017), de *Citrus limonia* (AMORIM, 2016; MARTINS, 2017), de *Citrus sinensis* (ADAMS, 2007; LIU, 2014; NAIR, 2018; NAJAR 2020; OYEDDEJI, 2020; TIRADO, 1995; TAO, 2009), de *Citrus grandis* (ADAMS, 2007, CHEN, 2018), de *Citrus medica limonum* (ADAMS, 2007; BHUIYAN, 2009; LOTA, 2001; LOU, 2017), de *Citrus aurantium dulcis* (ADAMS, 2007, ANDRADE, 2014; ARAUJO, 2020; YOO, 2004) e de *Citrus reticulata* (ADAMS, 2007, DIAS, 2020; MARTINS, 2017; TU, 2002).

Diversas propriedades farmacológicas já foram atribuídas ao D-limoneno: antitumoral (ELSON, 1988; TRAPASSO, 2013), antinociceptiva (PICCINELI, 2017), gastroprotetora e cicatrizante de úlcera gástrica (MORAES, 2009), antioxidante

(ROBERTO, 2010, BACANLI, 2015) e antiinflamatória (D’ALESSIO, 2010; PATEL, 2020).

Ainda, Muñoz (2020) observou que o D-limoneno (600 µM) apresentou atividade contra a *Candida albicans*. Já Meeran (2020) demonstrou o potencial deste composto para limitar a gravidade e a progressão do COVID-19, devido às suas propriedades imunomoduladoras, antiinflamatórias e antivirais. Segundo Kumar (2020), o D-limoneno apresenta ação antiviral contra COVID-19, pois atua no receptor da enzima conversora de angiotensina 2, o qual parece atuar na entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula hospedeira.

## 5.2 TESTE DE DESINTEGRAÇÃO

Foi realizada análise exploratória (avaliação da distribuição) do conjunto dos dados encontrados para investigar os pressupostos estatísticos, visando o adequado uso das técnicas de análise. Foram realizados dois testes estatísticos, sendo eles Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Ao observar os resultados, foi possível concluir que os mesmos não apresentaram uma distribuição normal (ao nível de significância de 95%), visto que para o teste de Kolmogorov-Smirnov no tempo de 5 minutos apurou-se com *significância (sig)* = 0,12 e para de 15 minutos o *sig* = 0,00. Para o teste de Shapiro Wilk, o resultado apresentado em ambos os tempos foi de *sig* = 0,00 (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Normalidade.

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	Graus de liberdade	<i>sig</i>	Estatística	Graus de liberdade	<i>sig</i>
5 minutos	,161	39	,012	,850	39	,000
15 minutos	,287	39	,000	,729	39	,000

*sig* = significância

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Em seguida, foi aplicado o teste de Levene, com base na média dos resultados encontrados. Foi identificado que a distribuição não apresenta homogeneidade, ou seja, a variância da perda de peso é diferente entre os grupos ao nível de confiança

de 95%, uma vez que para 5 minutos resultou no  $sig=0,001$  enquanto para 15 minutos deu-se o  $sig=0,023$  (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Homogeneidade.

		Estatística de Levene	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	sig
5 minutos	Com base em média	4,230	12	26	,001
	Com base em média aparada	3,770	12	26	,002
15 minutos	Com base em média	2,527	12	26	,023
	Com base em média aparada	2,279	12	26	,038

*sig = significância*

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Devido à distribuição dos dados não ser normal e tampouco homogênea, optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis. A partir desse teste, é possível evidenciar que existem diferenças estatísticas entre as substâncias-teste na desintegração da guta percha, tanto no tempo de 5 minutos, com o valor de  $sig=0,02$  ( $X^2(12)=31,250$ ;  $p= 0,002<0,05$ ) quanto no de 15 minutos [ $sig=0,01$  ( $X^2(12)=33,387$ ;  $p= 0,001<0,05$ )] (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação estatística dos dados pelo teste Kruskal-Wallis<sup>a,b</sup>

	5 minutos	15 minutos
H de Kruskal-Wallis	31,250	33,387
Graus de liberdade	12	12
Significância Sig.	,002	,001

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Após 5 minutos de exposição, as substâncias testadas que demonstraram melhores resultados e mesmo grau de efetividade estatisticamente foram: *Citrus aurantium dulcis* (óleo 7), *Citrus reticulata* (óleo 8), *Citrus sinensis* (óleo 9), Endolsov (C2) e Clorofórmio (C3), todos ao nível de significância de 5%. Ressalta-se que esses óleos supracitados apresentaram resultados estatísticos semelhantes aos controles Endosolv® E e clorofórmio e superiores ao controle eucaliptol (C1) (Tabela 6). Já os



óleos 10 (*Citrus sinensis*), 1 (*Citrus aurantium var.amara*) e 2 (*Citrus deliciosa*) são estatisticamente semelhante ao Endosolv® E (C2) e superior ao eucaliptol (C1).

Tabela 6: Subconjuntos homogêneos, no tempo de 5 minutos, pelo teste de Kruskal Wallis.

	Subconjunto					
	1	2	3	4	5	6
C1	6,667					
4	6,667					
3	8,000	8,000				
5	12,833	12,833	12,833			
6	13,500	13,500	13,500	13,500		
10	14,000	14,000	14,000	14,000	14,000	
Amostra <sup>1</sup> 1	19,833	19,833	19,833	19,833	19,833	
2	21,167	21,167	21,167	21,167	21,167	
7		27,333	27,333	27,333	27,333	27,333
8			29,667	29,667	29,667	29,667
C2				30,000	30,000	30,000
9					32,333	32,333
C3						38,000
Estatística de teste	12,498	11,530	12,120	12,497	11,692	7,967
Sig. (teste de 2 lado(s))	,085	,073	,059	,052	,069	,093
Sig. Ajustada (teste de 2 lado(s))	,135	,132	,107	,094	,125	,224

Subconjuntos homogêneos são baseados em significâncias assintóticas. O nível de significância foi de 0,05. <sup>1</sup>Cada célula mostra o posto médio de amostra de 5 minutos. C1- eucaliptol, C2- endosolv® E, C3-clorofórmio.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Após o tempo de 15 minutos de exposição, o clorofórmio (C3) foi superior a todas as substâncias-teste, o que já era esperado pois este é o padrão ouro na dissolução de guta percha. Em seguida, as substâncias mais efetivas sem diferenças estatísticas entre si foram: o controle Endosolv® E (C2) e os óleos *Citrus sinensis* (9), *Citrus reticulata* (8), *Citrus aurantium dulcis* (7) e *Citrus aurantium var. amara* (1). Ressalta-

se que os óleos mencionados anteriormente foram superiores ao controle 1 - eucalipto (Tabela 7).

Tabela 7: Subconjuntos homogêneos, no tempo de 15 minutos, pelo teste de Kruskal Wallis.

	Subconjunto					
	1	2	3	4	5	6
3	2,667					
C1	5,000	5,000				
5	9,500	9,500	9,500			
4	11,500	11,500	11,500	11,500		
6		17,000	17,000	17,000		
10		17,667	17,667	17,667		
Amostra <sup>1</sup> 2			20,000	20,000		
1			22,333	22,333	22,333	
7			24,000	24,000	24,000	
8			27,333	27,333	27,333	
9				30,000	30,000	
C2					35,000	
C3						38,000
<b>Estatística de teste</b>	7,269	8,857	13,549	13,253	8,833	<sup>2</sup>
<b>Sig. (teste de 2 lado(s))</b>	,064	,065	,060	,066	,065	
<b>Sig. Ajustada (teste de 2 lado(s))</b>	,193	,160	,095	,105	,161	

Subconjuntos homogêneos são baseados em significâncias assintóticas. O nível de significância foi de 0,05. <sup>1</sup>Cada célula mostra o posto médio de amostra de 15 minutos. <sup>2</sup>Não é possível calcular, pois apresenta uma amostra apenas.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Ao analisar os resultados nos diferentes tempos de exposição (5 e 15 minutos), é possível observar que os óleos 1 (laranja amarga - *Citrus aurantium var. amara*), 7

(laranja doce - *Citrus aurantium dulcis*), 8 (tangerina Pokan - *Citrus reticulata*) e 9 (laranja doce var, pera - *Citrus sinensis*) apresentaram os melhores resultados, sendo estes superiores ao controle 1 (eucaliptol) e estatisticamente semelhantes ao controle 2 (Endosolv®E).

Em relação ao controle 3 (clorofórmio), é possível afirmar que no tempo de 5 minutos este foi semelhante aos óleos supracitados, exceto o óleo 1. Após 15 minutos de exposição, o clorofórmio apresentou superioridade quando comparado a todas as substâncias testadas, situação compreensível, visto que ele é o composto padrão ouro na dissolução de guta percha.

Magalhães (2007), empregando condições analíticas semelhantes à nossa (pesagem antes e após exposição ao solvente e tempo de 5 minutos de exposição), demonstrou que os resultados do óleo de *Citrus aurantium*, eucaliptol e clorofórmio foram semelhantes, concordando parcialmente com os nossos, já que o óleo 7 apresentou resultado semelhante ao clorofórmio; porém discorda ao comparar com eucaliptol que apresentou baixa efetividade.

Martos (2011) avaliou o óleo essencial de laranja doce (sem especificação do gênero), o eucaliptol e o clorofórmio na dissolução de vários cimentos endodônticos (RoekoSeal®, Sealer 26®, Epiphany®, EZ-Fill® e Endomethasone®) de canais radiculares e demonstrou que as substâncias testadas foram estatisticamente semelhantes, discordando do presente estudo, pois os óleos 7-9 foram superiores ao eucaliptol em ambos os tempos. Quando comparado ao clorofórmio, o estudo corrobora no tempo de 5 minutos se comparado aos óleos 7-9 e discorda se comparado aos óleos 1, 4 e 10. No tempo de 15 minutos, nenhum óleo foi superior ao clorofórmio no nosso estudo.

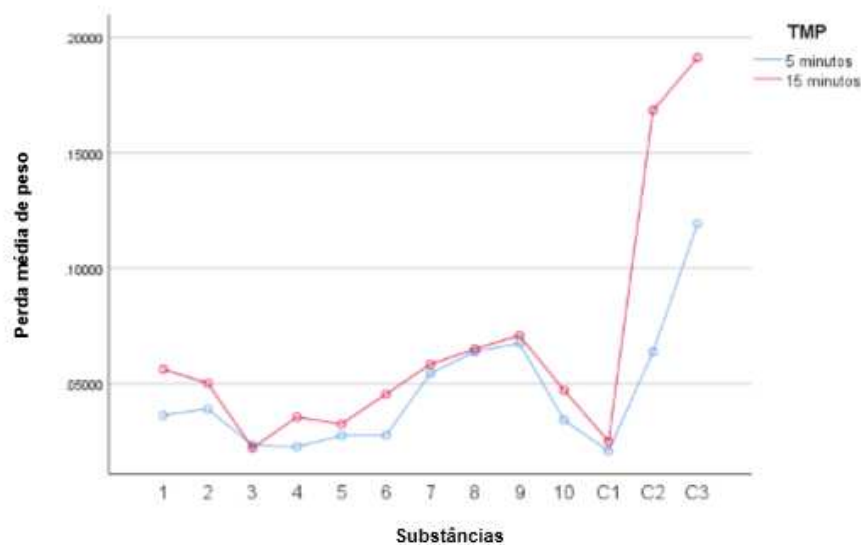
A metodologia empregada neste estudo foi semelhante àquela realizada por Ramos (2016), porém os resultados diferem, já que o óleo essencial de laranja e o eucaliptol não apresentaram diferenças estatísticas entre si, discordando do nosso estudo, em que o eucaliptol apresenta uma capacidade solvente inferior aos óleos 7-9 em ambos os tempos de exposição. O presente estudo está de acordo quando comparado aos óleos de 3-5, os quais são estatisticamente semelhantes ao eucaliptol em todos os tempos avaliados. Entretanto, ressalta-se que o autor não identificou a espécie vegetal da qual foi extraída o óleo essencial.

Tanomaru-Filho (2010) demonstrou que o óleo de laranja e o eucaliptol exibiram efeitos semelhantes frente à guta percha, discordando do presente estudo, no qual

os óleos 7-9 foram superiores ao eucaliptol. Observando-se os óleos 3-5, em ambos os tempos de avaliação (Tabela 1), percebemos que eles são estatisticamente semelhantes ao eucaliptol, corroborando com o autor supra-citado.

Ao avaliar a Figura 3, todos os óleos testados, assim como o controle 1, apresentaram ações semelhantes tanto no tempo de 5 minutos quanto em 15 minutos. Porém, é possível perceber que no tempo de 15 minutos há uma desintegração da guta percha maior nos controles 2 e 3, sendo essas mais evidentes do que no tempo de 5 minutos. Reitera-se que o atendimento clínico ao paciente deve, se possível, ser realizado no menor tempo, tanto para o conforto do paciente quanto financeiramente (VIOLA, 2011), por conta também da saturação do solvente, existe a necessidade de renovação do produto (TREVISAN, 2017).

Figura 3: Desintegração da guta percha nos períodos de tempo de 5 e 15 minutos.



TMP: Tempo médio de perda

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

### 5.3 ENSAIO DE DUREZA

Ao analisar os dados coletados, em relação à normalidade, através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, é possível observar que eles apresentaram uma distribuição normal ao nível de significância de 95% -  $p > 0,05$ , sendo o  $sig=0,200$

para o teste Kolmogorov-Smirnov e  $sig = 0,056$  para o teste de Shapiro-Wilk (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Normalidade.

Tempo 5 min		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	Graus de liberdade	Sig.	Estatística	Graus de liberdade	Sig.
Força (N)	5	,081	52	,200*	,957	52	,056

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a- Correlação de Significância de Lilliefors

*sig.* = significância

N- Newtons

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para avaliar a homogeneidade de variâncias dos dados, tendo como base a média dos dados encontrados, utilizou-se o teste de Levene. A partir dele, foi possível afirmar que, ao nível de confiança de 95%  $p > 0,05$ , a variância das médias dos dados apresentados foi homogênea, devido ao  $sig = 0,496$  (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliações preliminares para verificação de atendimento do pressuposto estatístico de Homogeneidade.

		Estatística de Levene	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Sig.
Força(N)	Com base em média	,967	12	39	,496
	Com base em média aparada	,964	12	39	,498

*sig.* = significância

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Devido à normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias, optou-se pelo teste ANOVA, que visa verificar se existem diferenças entre as médias das forças de penetração aplicadas em relação a substância teste utilizada. A partir do teste mencionado acima, foi possível afirmar que existem diferenças estatísticas nas

médias das forças entre os grupos analisados, visto que apresentou sig = 0,018 (  $Z(12,39) = 2,422$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabela 10).

Tabela 10: Teste ANOVA em relação à média das forças de penetração aplicadas dependente do tratamento de superfície realizado.

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Sig.
Entre Grupos	61,436	12	5,120	,018
Nos grupos	82,427	39	2,114	
Total	143,863	51		

Fonte: Elaborada pela autora, 2022

O teste *post-hoc* de Duncan (Tabela 11) realizado após o teste ANOVA, para identificar quais os grupos que diferem entre si estatisticamente com intervalo de confiança de 95%, mostrou que em média o grupo que apresentou melhor resultado, ou seja, menor força necessária para deslocar o espaçador por 5 mm (JANTARAT, MALHOTRA e SUTIMUNTANAKUL, 2013), foram os óleos *Citrus aurantium dulcis* (7), *Citrus deliciosa* (2), *Citrus aurantium var. amara* (1), *Citrus medica limonum* (6), *Citrus sinensis* (9), *Citrus grandis* (5), *Citrus reticulata* (8), *Citrus sinensis* (4), *Citrus limonia* (3) e os controles clorofórmio (C3) e Endosolv<sup>®</sup> E (C2). O controle 1 (eucaliptol) apresentou menor efetividade quando comparado a todas as substâncias testadas. Com relação aos óleos testados, o óleo 7 (*Citrus aurantium dulcis*) se destacou sendo estatisticamente semelhante ao controle 3 (clorofórmio) e ao controle 2 (Endosolv<sup>®</sup> E) e muito superior ao controle 1 (eucaliptol).

Tabela 11: Subconjuntos das substâncias-teste pelo teste *post-hoc* de Duncan para o ensaio de dureza.

<b>Força (N)</b>				
Teste de Duncan <sup>a</sup>				
Substância Testada	Amostra (n)	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
7	4	1,5075		
2	4	1,9200		
1	4	2,2400	2,2400	
6	4	2,2400	2,2400	
9	4	2,2400	2,2400	
5	4	2,3275	2,3275	
8	4	2,6725	2,6725	
C3	4	3,0150	3,0150	
4	4	3,2750	3,2750	3,2750
C2	4	3,5325	3,5325	3,5325
3	4	3,7475	3,7475	3,7475
10	4		4,4850	4,4850
C1	4			5,5600
Sig.		,073	,071	,052

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

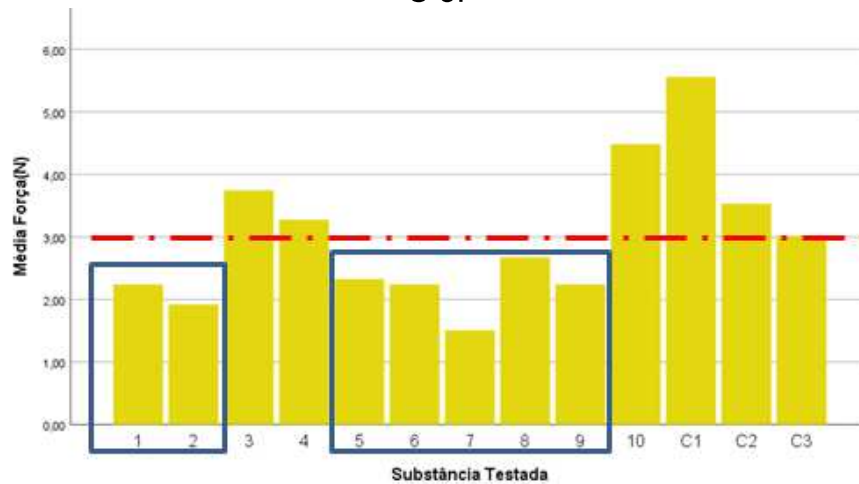
a. Usa o Tamanho da Amostra de Média Harmônica = 4,000.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Resumidamente, os controles comercializados atualmente, tais como clorofórmio, Endosolv<sup>®</sup>E e o eucaliptol necessitaram de uma força média para deslocar o espaçador por 5 mm de 3,01N; 3,53N e 5,56N, respectivamente. O eucaliptol foi o composto que exibiu a menor efetividade dentre todas as testadas. Os óleos 1, 2, 5-9 apresentaram melhores resultados em relação aos controles. Dentre todas as substâncias testadas, o óleo essencial 7 foi o que modificou de forma mais intensa a estrutura da guta percha, sendo necessária uma força média de apenas 1,5 N para deslocar o espaçador (Figura 4).



Figura 4: Avaliação da dureza para as substâncias-teste. O clorofórmio (C3 - a linha vermelha) apresentou melhor resultado entre os controles. Observam-se dentro dos retângulos azuis os óleos que apresentaram melhor resultado quando comparado ao C 3.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

No estudo conduzido por Faria-Junior (2011) para remoção de guta percha, o óleo de laranja e o eucaliptol apresentaram efetividade semelhante, discordando em parte do nosso experimento já que o óleo 7 foi estatisticamente superior ao eucaliptol. Porém, se avaliarmos os óleos 4 e 10, ambos extraídos da casca de plantas popularmente chamadas de laranja doce, esses são semelhantes ao eucaliptol. A falta de identificação do gênero da planta dificulta a comparação dos estudos, já que o autor analisou o óleo de laranja comercial da Biodinâmica (Ibiporã, PR, Brasil), cuja bula apenas cita a presença de terpenos de laranja.

Jantarat e colaboradores (2013) também empregaram metodologia similar à do nosso estudo para o teste de dureza e também utilizou óleo essencial de fonte comercial (Indústria de Sabores e Fragrâncias Thai–China, Nonthaburi, Thailandia). No entanto, o autor não forneceu a identificação do gênero da planta e não foi identificado o perfil fitoquímico do óleo. Segundo o autor, o solvente mais eficiente foi o clorofórmio, seguido pelos óleos de *grapefruit* e tangerina, enquanto os piores resultados foram os dos óleos de lima e de limão. Tais resultados discordam do atual estudo em que o clorofórmio apresenta resultados estatísticos semelhantes aos óleos de *grapefruit* (5), tangerina (8), limão (3 e 6) e corrobora com o estudo quando comparado ao óleo essencial de lima (10), o qual também apresentou baixa eficiência. Essa diferença poderia ser explicada devido à composição química dos óleos, porém a falta dessa informação no artigo analisado, o que limita o comparativo. Destaca-se



que o autor não avaliou o óleo 7 (laranja doce) que apresentou ótimo resultado no nosso ensaio.

No estudo conduzido por Martos e colaboradores (2011), o óleo de laranja comportou-se de maneira semelhante ao eucaliptol, corroborando com o presente estudo se comparado aos óleos 4 (laranja valência) e 10 (laranja-lima) e discordando se comparado aos óleos 7 (laranja doce), 1 (laranja amarga) e 9 (laranja doce). De novo, a falta não só da identificação do gênero da planta, mas também da composição química dificultam a análise comparativa dos resultados, visto que no artigo foi apenas citado que o óleo de laranja utilizado foi comercial (Orangeform, Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil).

O presente estudo corrobora com a pesquisa realizada por Rehman, Khan e Aman (2013) em que não houve diferença estatística entre o clorofórmio e o óleo de laranja na remoção da guta percha do canal, pois o óleo 7 apresentou efetividade semelhante ao clorofórmio. Destaca-se que a origem do óleo essencial, a identificação botânica e a composição fitoquímica não foram descritas pelos autores.

Trevisan e colaboradores (2017) avaliaram a efetividade do eucaliptol e do óleo de laranja comercial da Biodinâmica (Ibiporã, PR, Brasil), em que não há identificação da espécie vegetal, na dissolução do cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE) e observou que o óleo de laranja foi mais eficiente que o eucaliptol. No presente estudo foi realizada a dissolução em relação à guta percha e o resultado foi semelhante se comparado aos óleos 7 (laranja doce), 1 (laranja amarga) e 9 (laranja doce), já que o cimento a base de óxido de zinco e eugenol é muito utilizado na prática clínica devido ao seu custo-benefício. Já o estudo conduzido por Yadav *et al.* (2016), também sem identificação da origem do óleo e da espécie vegetal, demonstrou que o óleo de laranja e o eucaliptol não apresentaram diferença significativa quanto solventes de cimento ZOE, corrobora com o estudo atual, se comparado aos óleos 4 (laranja valência) e 10 (laranja-lima).

Para realizar uma análise comparativa mais fidedigna é necessária a identificação da planta e também a composição fitoquímica do óleo, visto que a mesma modifica quantitativamente em diferentes condições de extração, parte da planta empregada, maturação do fruto e tempo de colheita (MINTEGUIAGA, 2017; NAWAZ, 2020). Os óleos essenciais de laranja são uma alternativa a utilização de solventes orgânicos (SCELZA, 2006), porém ainda são escassas na literatura científica informações sobre a composição química e a identificação da espécie

vegetal utilizada (FARIA-JUNIOR, 2011; JANTARAT, 2013; MARTOS, 2011; RAMOS, 2016; REHMAN, 2013; TANOMARU-FILHO, 2010; TREVISAN, 2017; YADAV, 2016). Essa foi uma das grandes dificuldades no comparativo dos resultados, pois é notória a quantidade de trabalho que não informa essa origem.

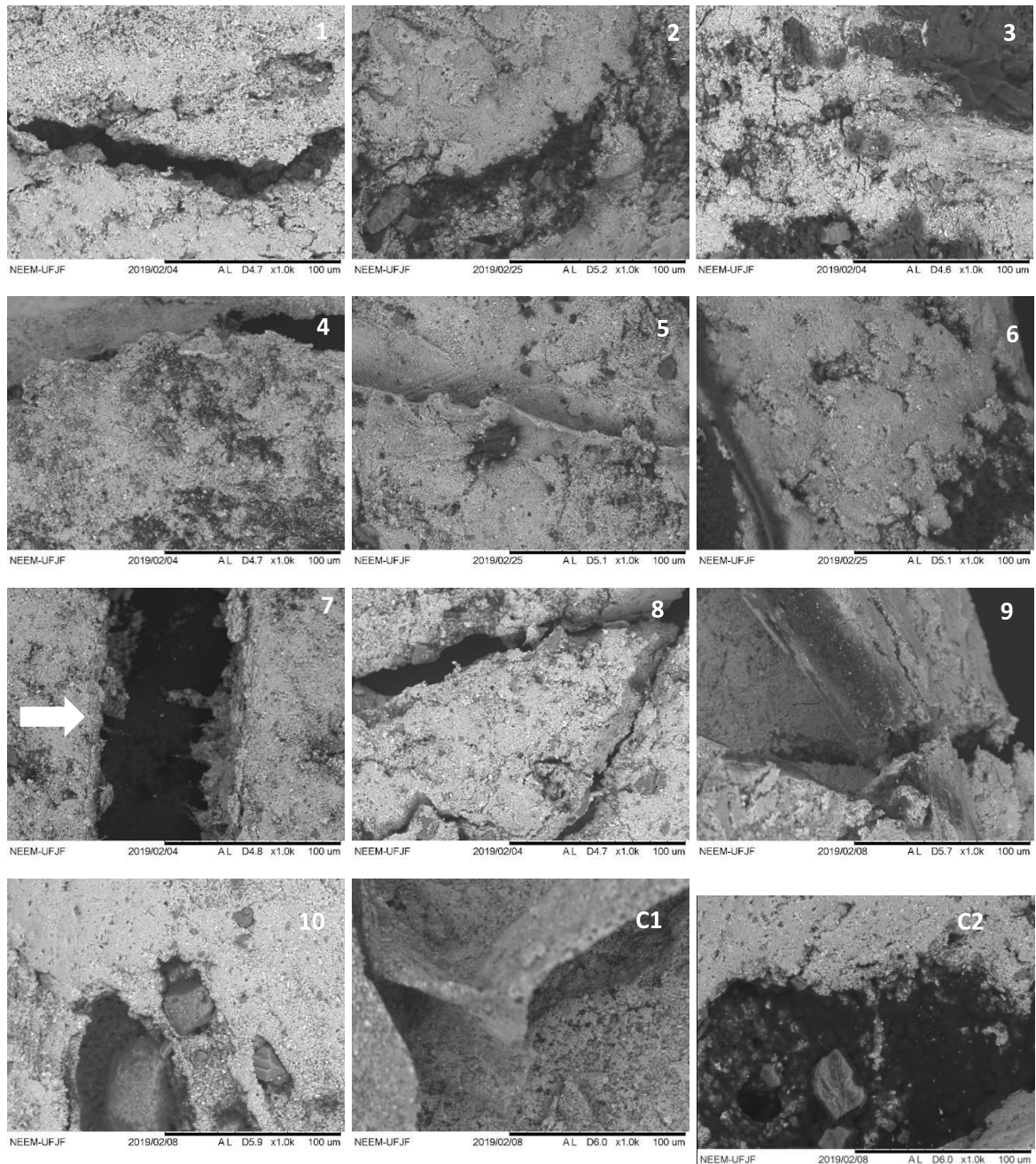
Observando os dois testes mecânicos efetuados (desintegração e dureza por penetração) o óleo 7 (*Citrus aurantium dulcis* – laranja doce) se destaca em ambas metodologias.

Além de apresentar elevada efetividade quanto a plastificação da guta percha, os óleos essenciais apresentam efetividade sobre cimentos endodônticos AH Plus®, Apexit Plus® e Endoflas FS® (MUSHTAQ, 2012); não apresentam efeitos adversos sobre a resistência de união dos adesivos (DEMIBUGA, 2016); não influenciam a união de pinos de fibra de vidro à dentina (GUEDES, 2014); não diminuem a microdureza da dentina radicular (KHEDMAT, 2015) e, assim como o clorofórmio e o eucaliptol, não resultam em paredes radiculares completamente livres de material obturador (CASTRO, 2018).

#### 5.4 ANÁLISE DE SUPERÍCIE DOS CONES DE GUTA PERCHA

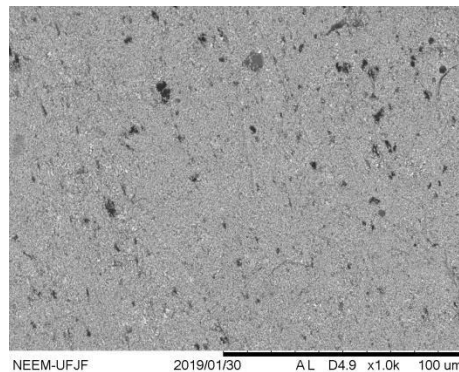
Os resultados das análises das imagens obtidas por MEV sobre as alterações superficiais nos cones de guta percha submetidos ao tratamento com os diferentes óleos essenciais e controles estão dispostos na Figura 5, bem como na Figura 6 é possível observar a superfície do cone de guta percha sem tratamento.

Figura 5: Fotomicrografias, representativas de cada grupo experimental, mostradas após a imersão do cone de guta percha nas substâncias-teste por 5 minutos.



Observa-se no canto superior direito o número que indica a substância a qual a guta percha foi exposta (1- *Citrus aurantium var.amara*, 2- *Citrus deliciosa*, 3- *Citrus limonia*, 4- *Citrus sinensis*, 5- *Citrus grandis*, 6- *Citrus medica limonum*, 7- *Citrus aurantium dulcis*, 8- *Citrus reticulata*, 9- *Citrus sinensis*, 10- *Citrus sinensis*, C1- *eucalipto*, C2-*endosolv® E*). É evidente que a guta percha-percha exposta ao óleo 7 apresenta uma fratura completa da superfície, indicado pela seta branca. Aumento de 1000x. Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Figura 6: Eletromicrografia da superfície da guta percha sem exposição aos solventes.



Aumento de 1000x. Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Pela análise das superfícies dos cones de guta percha, é notável a evidente fratura promovida pelo óleo 7, alterando a mesma de forma permanente, propiciando o rompimento completo do cone, e desta forma, demonstrando sua efetividade como solvente endodôntico. Este dado é concordante com o obtido por Almeida e Freitas (2022), em que o óleo de laranja (citrol) auxiliou a remoção de guta percha do canal radicular.

Camões e colaboradores (2010) demonstraram, por meio de MEV, que óleo de laranja (*Orange form* – Fórmula e Ação laboratório farmacêutico, SP) e eucaliptol (*SS White* – RJ) apresentaram efetividade semelhante na remoção de guta percha do canal radicular. Nossos resultados são discordantes, visto que o óleo de laranja doce (óleo 7) foi superior na remoção da guta percha quando comparado ao eucaliptol. Essa diferença pode ser justificada pela diferença nas condições do procedimento analítico.

## 5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Apenas os óleos essenciais (óleo 1 - *Citrus aurantium var. amara*, óleo 4 - *Citrus sinensis* e óleo 5 - *Citrus grandis*) apresentaram eficácia contra a *Candida albicans* ATCC 10231, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12: Atividade antifúngica contra a *Candida albicans* das substâncias-teste avaliadas.

Substância Testada	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )
Óleo 1	250	500
Óleos 2, 3,6,7,8 e 9	>1000	>1000
Óleos 4 e 5	1000	1000
C1 - Eucaliptol	>1000	>1000
C2 - Endosolv® E	>1000	>1000
C3 - Clorofórmio	>1000	>1000
Nistatina	8UI	32UI

CIM = Concentração inibitória mínima; CFM = Concentração fungicida mínima. Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

O óleo 1 demonstrou ação fungicida frente a *Candida albicans* ATCC10231 (CFM = 500  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo o óleo com melhor atividade antimicrobiana. Este dado é concordante com resultados de Oliveira (2014) e Nidhi e colaboradores (2020), no qual o óleo essencial da mesma espécie vegetal exibiu a mesma ação.

O presente estudo concorda parcialmente com os resultados obtidos Oikeh (2020) em que o óleo da semente da fruta de *Citrus sinensis* também exibiu ação fungicida (CFM = 100  $\mu\text{g/mL}$ ) contra a cepa de *Candida albicans*; contudo o valor de CFM obtido pelo autor foi menor que o demonstrado pelo óleo da casca da fruta que analisamos. Esta diferença possivelmente pode ser explicada pela parte da planta da qual foi extraído o óleo.

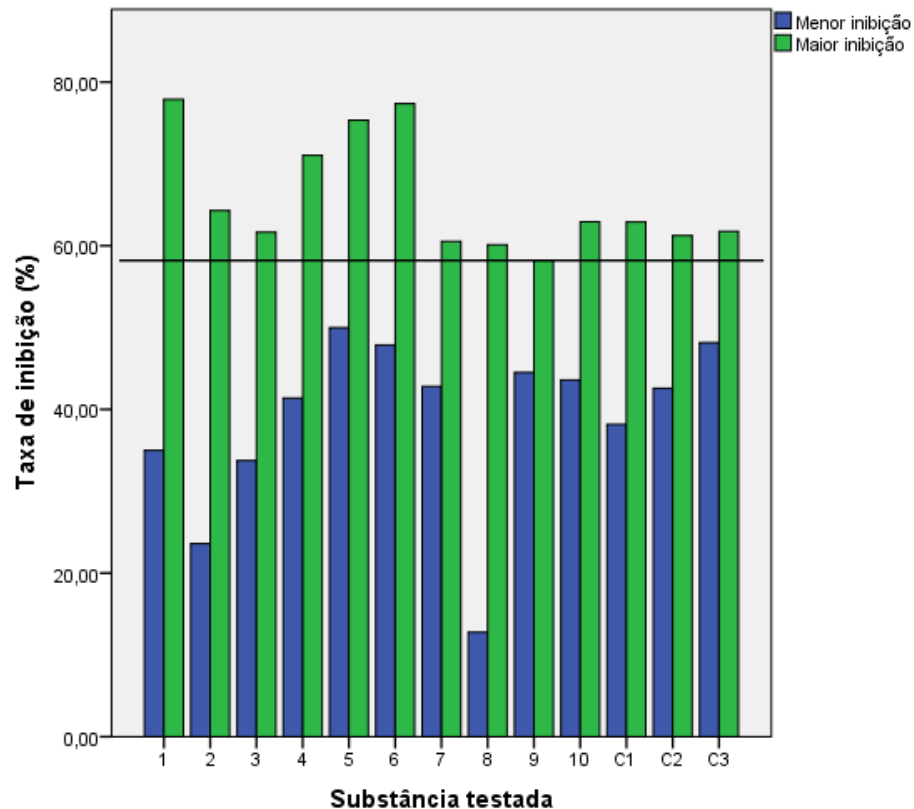
O óleo essencial da casca de *C. grandis* apresentou CIM e CFM de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , corroborando com o estudo de Tsai (2017), embora o autor tenha avaliado o óleo extraído da folha e não da casca da fruta. Já Elalfi (2018) demonstrou que o óleo da casca de *C. grandis* (1,42 mg/mL) inibiu 50% o biofilme de *C. albicans*.

A atual pesquisa concorda com pesquisa desenvolvida por Saleem (2020), já que ambos encontraram o valor da CIM maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$  para *C. limonia* (óleo 3).

Com relação à bactéria *Enterococcus faecalis*, nenhum óleo essencial ou controle teve efeito bactericida. Porém, as substâncias testadas apresentaram efeito bacteriostático, ocorreu inibição do crescimento bacteriano, quando comparado ao controle positivo da metodologia (inóculos sem adição da substância-teste).

As maiores taxas de inibição de crescimento variaram de 58,20% no óleo 9 (*Citrus sinensis*) e 77,88% no óleo 1 (*Citrus aurantium*), conforme Figura 7.

Figura 7: Taxa de inibição de crescimento de *E. faecalis* por substância testada.



A barra azul indica a menor taxa de inibição de crescimento encontrada em relação ao controle positivo da metodologia (inóculos sem adição de substância-teste), a barra verde indica a maior taxa de inibição de crescimento em relação ao controle positivo (inóculos sem adição de substância-teste).

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

O óleo 1 (*Citrus aurantium* var. *amara*) apresentou maior taxa de inibição de crescimento do microrganismo *E. faecalis*, atingindo 77,88%. Todas as substâncias testadas na maior taxa de inibição (coluna verde do Gráfico 3) inibiram mais de 50% do crescimento bacteriano. Continuando observando a maior taxa de inibição (coluna verde do Gráfico 3) observa-se que os óleos 1, 2, 4, 5, 6 e 10 apresentaram uma maior inibição do crescimento bacteriano que os controles dos solventes C1 (eucaliptol), C2 (Endosolv®E) e C3 (clorofórmio). Na Tabela 13 é possível encontrar qual foi a menor e a maior taxa de inibição de crescimento e a concentração referente.

Tabela 13: As menores e maiores taxas de inibição de crescimento (%) do *E. faecalis* em relação a concentração encontrada.

Substância Testada	Inibição min./ máx.(%)	Concentração referente a inibição (µg/mL)
<b>Óleo 1</b>	35,00	15,62
	77,88	1000
<b>Óleo 2</b>	23,58	500
	64,29	62,5
<b>Óleo 3</b>	33,74	125
	61,66	3,9
<b>Óleo 4</b>	41,38	125
	71,04	15,62
<b>Óleo 5</b>	49,99	15,62
	75,34	1000
<b>Óleo 6</b>	47,88	1,95
	77,35	7,81
<b>Óleo 7</b>	42,81	250
	60,54	3,9
<b>Óleo 8</b>	12,78	3,9
	60,13	7,81
<b>Óleo 9</b>	44,52	1000
	58,20	7,81
<b>Óleo 10</b>	43,60	31,25
	62,93	1,95
<b>C1- eucaliptol</b>	38,17	3,9
	62,89	7,81
<b>C2- endosolv E</b>	42,59	500
	61,24	3,9
<b>C3- clorofórmio</b>	48,16	125
	61,74	1000

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

O óleo 7 (*C. aurantium dulcis*) além de apresentar boa atividade solvente, como visto nos testes anteriores, demonstra uma taxa de inibição de crescimento do *E. faecalis* variando de 42% a 60%, observa-se que essa atividade não é a principal buscada para um solvente, porém a eliminação do *E. faecalis* auxilia extremamente no sucesso do retratamento. Já para o óleo essencial 1 (*C. aurantium var. amara*), apresentou variação de inibição de 35% a 77%. Tais resultados de efetividade estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Silva (2019), que encontrou atividade do óleo de *Citrus aurantium bregamia* contra *E. faecalis*, porém Silva (2019) conseguiu encontrar a CIM no valor de 219250 µg/mL e CBM= 219250 µg/mL, concentrações muito acima das testadas no presente estudo.

O óleo essencial 3 (*Citrus limonia*) variou de 33% a 61% de inibição de crescimento bacteriano, enquanto o óleo 6 (*Citrus medica limonum*) variou de 47% a 77% de inibição, corroborando com o estudo de Oliveria (2014), que também encontrou atividade antibacteriana do *C. limonum* chegando a uma redução do crescimento de *E. faecalis* em torno de 49,3%.

Os óleos essenciais 4, 9 e 10 (*Citrus sinensis*) demonstrou ação inibindo o crescimento bacteriano do *E. faecalis*, variando a taxa de inibição de 41,38% a 71,04%. Corroborando com o estudo Fisher (2009a) que demonstrou que o *blend* dos óleos essenciais de *Citrus sinensis* associado ao de *C. bergamia* exibiu atividade contra o *E. faecalis* resistente à vancomicina.

O óleo 8 (*Citrus reticulata*) apresentou inibição de crescimento bacteriano (*E. faecalis*) variando de 12% a 60%. Concordando com o estudo de Ayoola (2008) o qual também demonstrou a eficácia do óleo de *Citrus reticulata*. Gerhardt (2012) mostrou que além do óleo, o extrato de *Citrus reticulata Blanco* também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

A atividade antimicrobiana encontrada se deve ao fato dos óleos essenciais do gênero *Citrus* afetar diretamente a permeabilidade da membrana, a homeostase celular e reduzir a síntese de ATP no *Enterococcus faecalis*, resultando na inibição do crescimento ou morte celular (2009a). Nosso estudo corrobora com o experimento de Villa-Ruano (2018) que avaliou os compostos isolados (D-limoneno,  $\beta$ -pineno e o  $\alpha$ -terpineol) contra o *E. faecalis* e constatou que o D-limoneno,  $\beta$ -pineno e o  $\alpha$ -terpineol apresentaram atividade bacteriostática na concentração de 189, 203 e 149  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Destaca-se que em nosso estudo o D-limoneno está presente em todos os óleos essenciais, o  $\beta$ -pineno apenas não foi encontrado no óleo 4 (*C. sinensis*) e o  $\alpha$ -terpineol foi identificado somente nos óleos 4 (*C. sinensis*) e 10 (*C. sinensis*).

## 5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os óleos essenciais avaliados exibiram atividade antioxidante (Tabela 14) nas condições analíticas, porém essa não foi dose-dependente, ou seja, não apresentou uma relação linear entre a atividade biológica e a concentração testada. Portanto, não foi possível calcular a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>), ou seja, a concentração necessária para consumir 50% dos radicais livres presentes no DPPH.



Ao comparar com a maior atividade antioxidante encontrada nos controles: 19% para o Endosolv<sup>®</sup>E (C2), diversos óleos (1 a 4, 6, 7 e 9) apresentaram maior atividade (Figura 8).

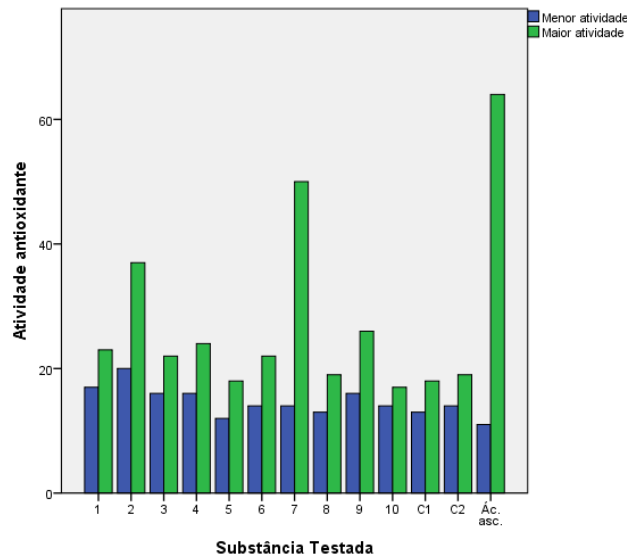
A faixa de inibição para os óleos essenciais foi de 11 a 50% e para os controles de 13 a 19%, nas condições analíticas. Dentre todas as substâncias-teste, o óleo 7 se destacou atingindo um maior percentual de inibição (50%). Apesar de o efeito antioxidante encontrado não ter sido elevado, vale ressaltar que essa atividade não é a principal pretendida para os óleos. No entanto, pode ser uma atividade adjuvante interessante para o retratamento endodôntico, visto que na maioria dos casos de retratamento a região do periápice encontra-se inflamada (BERGENHOLTZ, 2016).

Tabela 14: Atividade antioxidante das substâncias-teste pelo método de DPPH.

<b>Substância teste</b>	<b>Atividade antioxidante (mínima e máxima) (%)</b>
<b>Óleo 1</b>	17 e 23
<b>Óleo 2</b>	20 e 37
<b>Óleo 3</b>	16 e 22
<b>Óleo 4</b>	16 e 24
<b>Óleo 5</b>	12 e 18
<b>Óleo 6</b>	14 e 22
<b>Óleo 7</b>	14 e 50
<b>Óleo 8</b>	13 e 19
<b>Óleo 9</b>	16 e 26
<b>Óleo 10</b>	14 e 17
<b>Eucaliptol (C1)</b>	13 e 18
<b>Endosolv<sup>®</sup>E (C2)</b>	14 e 19
<b>Ác. ascórbico</b>	11 e 64*

\*Os resultados do ác. Ascórbico apresentaram uma relação de dose dependência.  
Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Figura 8: Atividade antioxidante das substâncias-teste pelo método de DPPH.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Todos os óleos de *Citrus aurantium* apresentaram atividade antioxidante, tanto o *Citrus aurantium dulcis* (óleo 7) quanto *Citrus aurantium var. amara* (óleo 1), concordando com diversos autores (ARAUJO, 2020; HSOUNA, 2013; SARROU, 2011; SHEN, 2017).

O óleo essencial 7 (*Citrus aurantium dulcis*) apresentou atividade antioxidante máxima de 50% na concentração de 1,95 µg/mL, concordando com o estudo de Hsouna (2013) em que o óleo essencial da casca do fruto de *C. aurantium* apresentou atividade de 50% numa concentração muito próxima de 1,8 µg/mL. Outro estudo desenvolvido por Araujo (2020) com micro cápsula de óleo essencial da casca do fruto de *Citrus aurantium dulcis*, concorda com o presente estudo, já que também encontrou atividade antioxidante.

A atividade antioxidante do óleo essencial 1 da casca de *Citrus aurantium var. amara* variou de 17% a 23%, concordando com Sarrou (2011) e discordando de Shen (2017). No estudo de Sarrou (2011), o óleo essencial da casca do fruto de *Citrus aurantium* apresentou a atividade antioxidante de 19,29% valor bem próximo ao encontrado em nosso experimento, porém não houve identificação da espécie vegetal. Shen (2017) não conseguiu demonstrar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Citrus aurantium var. amara*, pois ele testou o óleo extraído das flores secas e não da casca do fruto, provavelmente esse é o motivo da discordância entre os trabalhos.

O óleo essencial 2 (*C. delicosa*) teve sua atividade antioxidante variando de 20% a 37%. Diversos autores defendem que a casca contém grande quantidade de compostos fenólicos, os quais podem ser responsáveis pela elevada atividade antioxidante (ATES, 2017; BALASUNDRAM, 2006; SAHIN, 2015).

Os óleos essenciais 3 (*Citrus limonia*) e o 6 (*Citrus medica limonum*) apresentaram atividade antioxidante máxima de 22%, nas concentrações de 62,5 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. Tais resultados concordam com aqueles demonstrados por Menezes Filho (2020) que encontrou atividade antioxidante no óleo essencial da casca da fruta de *Citrus limonia* de 49,82% a 100% e 21,23% a 96,39% para frutos verdes e maduros, respectivamente. No entanto, para as maiores atividades, o óleo essencial foi avaliado puro (sem diluição). Chen (2020) também avaliou a capacidade antioxidante do *C. limonia*, porém utilizou o suco e a casca da fruta e encontrou maior atividade em sua casca.

Os óleos essenciais 4, 9 e 10 foram todos extraídos da casca do *C. sinensis* e apresentaram atividade antioxidante que variou de 16% ao máximo de 26%, sendo a maior atividade antioxidante observada no óleo 9. Tais resultados concordando com diversos estudos que demonstraram o potencial antioxidante dos óleos essenciais da casca de *C. sinensis* (EVRENDILEK, 2015; FARAHMANDFAR, 2019; LIN, 2021; YANG, 2017). Apesar do presente estudo não ter encontrado uma relação de dose dependência e consequentemente não sendo possível calcular a  $CI_{50}$ , o estudo de Farahmandfar (2019), a  $CI_{50}$  foi encontrada na concentração de 7,86 mg/mL, já para Yang (2017) foi de 2,19 mg/mL e para Lin (2021) 29,70 mg/mL ressalta-se que as concentrações encontradas na literatura para a  $CI_{50}$  são bem maiores que as testadas no experimento, onde a maior concentração testada foi de 0,25 mg/mL (250 µg/mL). Observa-se que mesmo sendo testado em baixas concentrações, o óleo essencial de *C. sinensis* apresenta atividade antioxidante. Pesquisadores atribuem a ação antioxidante da *C. sinensis* aos componentes fenólicos e flavonoides (GERACI, 2016, SOMMELLA, 2017).

O óleo essencial 5, da casca da *Citrus grandis*, apresentou atividade antioxidante máxima de 18 % na concentração de 250 µg/mL, concordando com o estudo de Tsai (2017) que encontrou atividade antioxidante no óleo essencial de *Citrus grandis*, porém ele utilizou o óleo essencial da folha e não da casca. Concordou parcialmente com o estudo de Ou (2015), pois na concentração de 40 mg/mL apresentou uma discreta atividade antioxidante de 2,32%.

O óleo essencial 8, da casca da *Citrus reticulata*, apresentou atividade antioxidante concordando com o estudo de Ishfaq (2021) e Lin (2021) em que esses óleos também apresentaram o mesmo potencial. No presente estudo, as inibições variaram de 13% e 19% para as concentrações 0,122 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente. Porém, no estudo realizado por Lin (2021), foi possível atingir uma inibição de 50%, devido a concentrações mais elevadas avaliadas para o óleo da casca do *Citrus reticulata* Blanco cv. Kibokuni (15,20 mg/mL) e para o *Citrus reticulata* Blanco (18,25 mg/mL).

De acordo com Farahmandfar (2019), o óleo essencial da mesma espécie vegetal pode apresentar diferentes capacidades antioxidantes, devido aos diversos fatores influenciam na mesma, tais como: composição do óleo ou fatores extrínsecos, como o método de secagem. Segundo Lin (2021), a atividade antioxidante do gênero *Citrus* está atrelada a concentração de timol e  $\gamma$ -terpineno, porém para Evrendilek (2015), a atividade antioxidante se deve aos componentes fenólicos. Sonbol (1992) defende que a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Citrus* se deve a maiores quantidades de geraniol, terpinoleno e  $\gamma$ -terpineno.

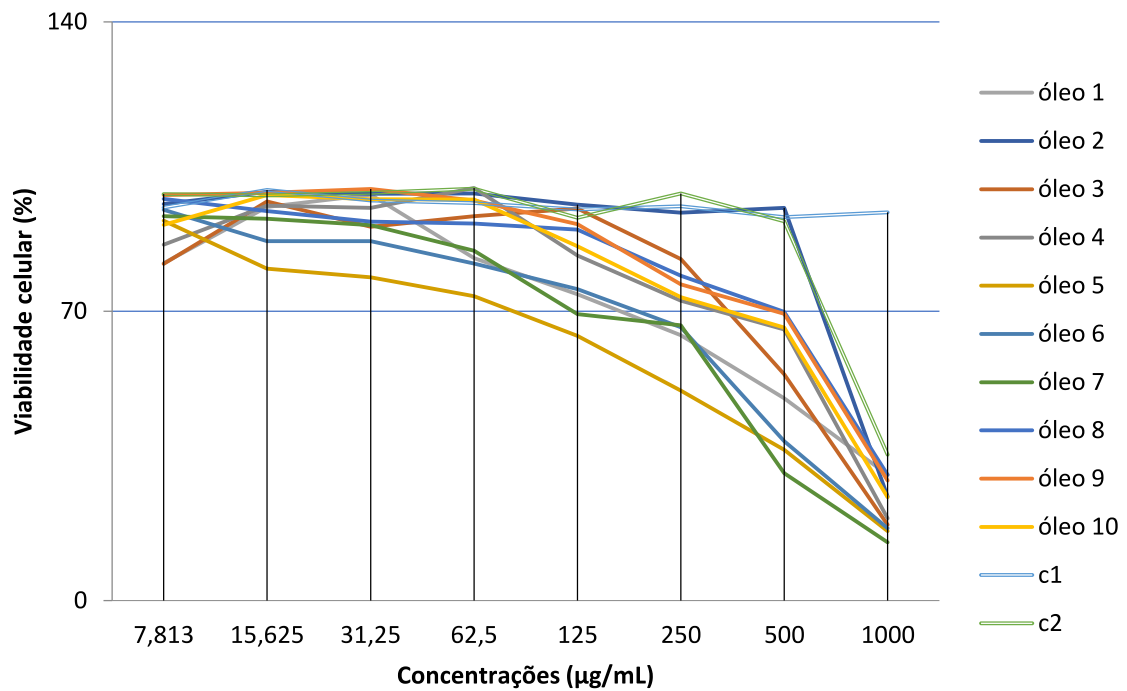
O óleo 7 que apresentou maior atividade antioxidante e tem em sua composição o  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e o  $\gamma$ -terpineno. Os óleos 2 e 9 que também dispõe de alta atividade, porém menor que o óleo 7, apresentam  $\beta$ -pineno e  $\beta$ -mirceno, linhas de pesquisa sobre o composto  $\gamma$ -terpineno e a atividade antioxidante devem ser investigas em pesquisas futuras.

Observando a inibição máxima de DPPH, os óleos essenciais 1 a 9 apresentaram atividade antioxidante semelhante ao controle 1 (eucaliptol), já os óleos 1 a 4, 6, 7 e 9 apresentaram melhor atividade que o controle 2 (Endosolv®E), sendo que o óleo 8 apresentou mesma atividade antioxidante que o controle 2.

## 5.7 CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular foi avaliada frente à linhagem celular sadia de fibroblastos murino (L929). Conforme a ISO 10993-5/2009, a substância-teste é considerada citotóxica se a viabilidade celular for menor que 70%. Nas concentrações de 7,81 µg/mL a 62,50 µg/mL, nenhum dos óleos avaliados e nem os controles foram considerados citotóxicos para esta linhagem celular (Figura 9).

Figura 9: Viabilidade celular de fibroblastos murino (L929) em função dos tratamentos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Conforme classificação da ISO 10993-5/2009, apenas o controle 1 (eucaliptol) não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, nem mesmo para a máxima concentração testada (1000 µg/mL). Dentre os óleos, o 2 foi o menos citotóxico e o 5 o que exibiu maior citotoxicidade. Na Tabela 15, é possível observar o percentual de viabilidade celular para cada substância de interesse, nas diversas concentrações testadas.

Tabela 15: Viabilidade celular (%) para cada substância-teste para a linhagem celular de fibroblasto murinho (L929) com sua respectiva concentração. Destaca-se as substâncias que apresentaram viabilidade menor que 70% conforme a ISO 10993-5/2009

Viabilidade Celular (%) para cada óleo testado												
Concentração testada (µg/mL)	Óleo 1	Óleo 2	Óleo 3	Óleo 4	Óleo 5	Óleo 6	Óleo 7	Óleo 8	Óleo 9	Óleo 10	C1	C2
7,813	81,59	95,89	81,41	86,11	91,91	94,52	92,96	97,19	98,08	90,9	95,07	98,3
15,625	95,26	98,86	96,57	95,54	80,25	86,97	92,35	94,2	98,6	98,06	99,31	98,04
31,25	98,16	98,37	90,4	95,02	78,16	86,95	90,78	91,66	99,55	97,05	96,77	98,65
62,5	82,86	98,5	92,96	99,79	73,61	81,55	84,64	91,16	96,76	97,01	96,13	99,64
125	74,1	95,8	94,85	83,46	64,04	75,35	69,26	89,72	91,07	85,67	94,63	92,62
250	64,14	93,82	82,63	72,52	50,82	66,15	66,55	78,59	76,5	73,42	95,38	98,45
500	48,93	95	54,74	65,56	36,44	38,52	30,79	69,84	69,38	66,03	92,77	91,72
1000	30,43	25,19	18,33	19,9	16,77	17,46	14,09	30,43	29,06	25,03	93,92	35,26

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Analisando a concentração de 500 µg/mL, apenas o óleo 2 e os controles 1 e 2 não foram citotóxicos. Na concentração de 250 µg/mL, os óleos 1 (*Citrus aurantium var.amara*), 5 (*Citrus grandis*), 6 (*Citrus medica limonum*) e 7 (*Citrus aurantium dulcis*) demonstraram suas citotoxicidades. Da mesma forma, na concentração de 125 µg/mL, os óleos 5 (*Citrus grandis*), e 7 (*Citrus aurantium dulcis*) exibem citotoxicidade conforme a ISO 10993-5/2009.

Não foram encontrados, na literatura científica, dados referentes à citotoxicidade de óleo de *Citrus grandis* frente a fibroblastos murinos (L929). No entanto, Elalfi (2018) avaliou a citotoxicidade do óleo essencial obtido da casca de *Citrus grandis* em linhagens celulares de fibroblastos pulmonares humanos e a concentração que permitiu a viabilidade celular maior que 70% foi de 250 µg/mL. No presente estudo, o valor encontrado para o óleo essencial da casca da fruta em questão foi de 62,5 µg/mL frente a fibroblastos murinos (L929).

O óleo essencial da folha do *C. limonia* (óleo 3) apresentou viabilidade celular até a concentração de 250 µg/mL com disponibilidade 82,36% das células, porém no estudo realizado por Najjar (2020) na concentração de 43,9 µg/mL havia viabilidade em apenas 50% das células. Essa diferença pode ser explicada pela linhagem celular já que no estudo de Najjar (2020) a célula utilizada foi de neuroblastoma. Já no estudo realizado por Martins (2017) observou-se que concentrações maiores ou iguais a 156,3 µg/mL reduziram significativamente a viabilidade celular, porém o estudo foi

conduzido com outra linhagem celular utilizando células de fibroblastos sadios oriundos de pulmão humano (GM07492-A). Segundo Lee (2017), a esculetina um composto fenólico isolado da *C. limonia* apresenta atividade antiproliferativa potente em linhas celulares de carcinoma pulmonar.

O óleo essencial da casca da fruta do *C. reticulata* (óleo 8) a concentração que permitiu viabilidade celular maior que 70% foi de 250 µg/mL, concordando com o estudo desenvolvido por Elalfi (2018) que encontrou mesma concentração de 250 µg/mL. Já no estudo conduzido por Martins (2017), concentrações maiores ou iguais a 1250 µg/mL reduziram significativamente a viabilidade celular, porém a linhagem celular era de células de fibroblastos sadios oriundos de pulmão humano (GM07492-A).

Todos os três óleos da casca do *C. sinensis* (óleos 4, 9 e 10) apresentaram viabilidade celular acima de 70% até a concentração de 250 µg/mL. Corroborando com os estudos de Souza (2021) e Keerthana (2021) que testaram os óleos nas concentrações de 150 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente, em ambos os estudos o óleo não foi citotóxico.

O presente estudo discorda da pesquisa desenvolvida por Najjar (2020) em que o óleo essencial de *C. sinensis* foi citotóxico na concentração de 87,9 µg/mL, com mortalidade de 50% das células, essa diferença na concentração pode ser explicada devido a linhagem celular que neste caso foi com células de neuroblastoma. Para Garcia (2017), o extrato de folhas secas da *C. sinensis* (35,75 µg/mL) matou 50% das células macrófagos (J774.G8).

Os óleos essenciais da casca de *Citrus aurantium* variação *amara* (1) e *dulcis* (7) na concentração de 250 µg/mL, apresentaram respectivamente viabilidade celular de 64% e 66%. Discordando do estudo de Najjar (2020), em que no valor de 82,81 µg/mL já apresentava mortalidade de 50% das células, essa diferença pode ser explicada devido às linhagens celulares, pois no trabalho do referido autor, foram empregadas células de adenocarcinoma mamário humano.

O óleo essencial 7 (*Citrus aurantium* variação *amara*) apresentou melhor resultado como solvente de guta percha nos testes mecânicos. Conforme a ISO10993-5/2009, o óleo essencial não apresentou citotoxicidade até a concentração de 62 µg/mL.

## 6. CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados sugere que o óleo essencial 7 (*Citrus aurantium dulcis*) é uma alternativa natural, viável e segura à utilização de solventes orgânicos convencionais, pois em 5 minutos apresentou os melhores resultados de desintegração, dureza e ainda exibiu atividades complementares desejáveis, como antioxidante, bacteriostática contra o *E. faecalis* ATCC 51299 e apresentou baixa citotoxicidade frente aos fibroblastos murinos (L929). Desta forma, preenche critérios técnicos para seu uso na Endodontia, em especial neste cenário de pandemia de COVID-19 que ainda estamos vivendo, reduzindo o tempo para realizar o retratamento endodôntico por meio de maior eficiência dos solventes empregados.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. M. *et al.* Protective effects of *Citrus limonia* oil against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, p. 41540–41550, 2020.
- ADAMS, ROBERT. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4Ed. Carol Stream: Allured publishing corporation, 2007.
- AJIKUMARAN, N. S. *et al.* Citrus peels prevent câncer. **Phytomedicine**, v. 50, p.231-237, 2018.
- ALDOGHAIM, F. S.; FLEMATTI, G.R.; HAMMER, K.A. Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian Eucalyptus Essential Oils. **Microorganisms**, v.6, p.1-11, 2018.
- ALESSANDRO, S. *et al.* Malaria pigment accelerates MTT – formazan exocytosis in human endothelial cells. **Parasitology**, v. 146, n.3, p.399-406, 2019.
- ALMEIDA, T.L.; FREITAS, A. T. “Análise da capacidade de remoção de material obturador com três tipos de instrumentos endodônticos,” facsete, acesso em 8 de março de 2022, [http:// www.funsap.edu.br/monografia/items/show/874](http://www.funsap.edu.br/monografia/items/show/874).
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- AKHLAGHI, N. M.; MOHAJERI, L.B.; FAZLYAB, M. Tissue Necrosis due to Chloroform: A Case Report. **Iranian Endodontic Journal**, v. 8, n. 4, p. 208-209, 2013.
- AMORIM, J. L. *et al.* Anti-inflammatory properties and chemical characterization of the essential oils of four *Citrus* species. **PLoS ONE**, v.11, n.4, p. 1-18, 2016.
- AN, J. *et al.* Low concentrations of FA exhibits the Hormesis effect by affecting cell division and the Warburg effect. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.183, p. 1-9, 2019.
- ANDRADE, B.F.M.T. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of essential oil research**, V. 26, N.1, P.34-40, 2014.
- ARAUJO, J. S. F. *et al.* Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium var.dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatina mixtures: Preparation, characterization, antimicrobial and antioxidante activities. **International Journal of biological macromolecules**, v.143, p. 991-99, 2020.
- ASCHENGRAU, A. *et al.* Long-Term Neurotoxic Effects of Early Life Exposure to tetrachloroethylene-contaminated Drinking Water. **Ann Glob Health**. v.82, n.1, p. 169–179, 2016.
- ASGARY, S. *et al.* Scanning elétron microscopy study of dental gutta=percha after cutting. **IEJ**. v.1, n.2, p.57-59, 2006.

- ASHRAF, H. *et al.* Presence of *Candida Albicans* in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions. **Iran Endod J**, v.2, n.1, 2007.
- ASSIS, M. F. L., *et al.* Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 15, n.3, p.425-432, 2002.
- ATES, F. *et al.* A Green Valorisation Approach Using Microwaves and Supercritical CO<sub>2</sub> for High-Added Value Ingredients from Mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) Leaf Waste. **Waste and Biomass Valorization**, v.10, p.533–546, 2019.
- AYOOLA, G. A. *et al.* Evaluation of the chemical constituents and the antimicrobial activity of the volatile oil of *Citrus reticulata* fruit (Tangerine fruit peel) from South West Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v.7n.13, p.2227-22331, 2008.
- BACANLI, M., BASARAN, A., BASARAN, N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. **Food and Chemical Toxicology**, v.81, p.160-170, 2015.
- BALASUNDRAM, N. S.*et al.* Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. v.99, n.1, p.191-203, 2006.
- BARNES, J.J., PATEL, S. Contemporary endodontics – part 1. **British Dental Journal**, v. 211, p.463–468, 2011.
- BARREIROS, A.L., *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**. v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BAYRAM, E. *et al.* Evaluation of Calcium Silicate Cement Bond Strength after Using Gutta-percha Solvents. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v..20, n.11, p.1417-1421, 2017.
- BEDNARCZUK, V.O.*et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão acadêmica**, v.11, n.2, p43-50, 2010
- BENKHALIFA M, *et al.* Mitochondria: participation to infertility as source of energy and cause of senescence. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 55, p.60-64, 2014.
- BERGENHOLTZ, G, Assessment of treatment failure in endodontic therapy. *Journal of Oral Rehabilitation*, **J Oral Rehabil.**, v.43, n.10, p.753-758, 2016.
- BHAGAVALDAS, M. C., *et al.* Efficacy of two rotary retreatment systems in removing Gutta-percha and sealer during endodontic retreatment with or without solvent: A comparative *in vitro* study. **J Conserv Dent.**, v.20, n.1 p.12-16, 2017.
- BHUIYAN, M. N. I.; BRGUN, J.; SARDAR, P.K.; RAHMAN, M. A. Constituents of Peel and Leaf Essential Oils of *Citrus Medica L.* **Journal of Scientific research**, v.1, n.2, p.387-392, 2009.
- BOMGARDER, M. Orange Crus. **Chem News Arch.**, v.89, p.21, 2011

BOUSSAADA, O. *et al.* Chemical composition of essential oils from Flowers, leaves and peel of *Citrus aurantium L. var. amara* from Tunisia. **Journal of essential oil bearing plants**, v. 9, n.2, p. 133-139, 2006.

BRANTLEY, W. A. *et al.*, Performance of Engine-Driven Rotary Endodontic Instruments with a Superimposed Bending Deflection: V. Gates Glidden and Peeso Drills. **Journal of Endodontics**, v.20, n.5, p.241-245, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS-PNPIC-SUS**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Ciência, Tecnologia, e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília. 2009.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada - rdc nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, 2014.

BRASIL, Portaria gm Nº 4.556, de 15 de março de 2021. Cria a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais - RENAMA no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, Brasília, DF, edição: 51, seção: 1, p.4, 2021.

BRITO-JUNIOR, M. Prevalência e etiologia do retratamento endodôntico - estudo retrospectivo em clínica de graduação. **Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo**, v.14, n.2, p.117-120, 2009.

CAMÕES, I.G.Z., *et al.* Comparação entre os solventes: Óleo de laranja e Eucaliptol no retratamento de canais radiculares. **Revista Fluminense de Odontologia**, n.34, p.29-35, 2010.

CAMPANER, M. *et al.* Biocompatibility and inflammatory response of conventional and CAD/CAM provisional restorations. **Journal Pre-proof**, p. 4-23, 2020.

CAMPELLO, A. F. *et al.* Influence of solvent and a supplementary step with a finishing instrument on filling material removal from canals connected by an isthmus. **Int Endod J**, v.52, n.5, p.716-724, 2019.

CANDAN F, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **J Ethnopharmacol**, v.87, p.215-220, 2003.

CARVALHO, C.S. *et al.* Decontamination of Gutta-percha Cones employed in Endodontics. **Acta odontol. Latinoam**, v.33, n.1, p.45-49, 2020.

CASTRO, *et al.* Evaluation of the efficacy of filling material removal and re-filling after different retreatment procedures. **Braz. Oral Res**, v.32, n. 94, p.1-7, 2018.

CEDERBERG, H.; HERIKSSON, J.; BINDERUP, M. DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. **Mutagenesis**, v. 25, n.2, p. 133–138, 2010.

- CICHOCKI, J. A. *et al.* Modulation of Tetrachloroethylene-Associated Kidney Effects by Nonalcoholic Fatty Liver or Steatohepatitis in Male C57BL/6J Mice. **Society of toxicology**, v. 167, n.1, p.126-137, 2019.
- CHEN, G. W., *et al.* Antibacterial Activity of Emulsified Pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) Peel Oil and Water-Soluble Chitosan on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules**, v.23, p.1-13, 2018.
- CHOUZA, X. Control de la autopolinización, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en mandarina 'Montenegrina'. **Agrociencia Uruguay**, v.15 n.1, p.27-36, 2011.
- CHUTICH, M. J. *et al.* Risk Assessment of the Toxicity of Solvents of Gutta-Percha Used in Endodontic Retreatment. **Journal of endodontics**, v.24, n.4, p.213-216, 1998.
- COLOMBO, A. P. M. *et al.* Efectiveness of the waveone and protaper d systems for removing gutta-percha with or without a solvente. **Acta Odontol. Latinoam**, v. 29, n.3, p.262-267, 2016.
- DAGNA, A. *et al.* Gutta-Percha Solvents Alternative to Chloroform: An In Vitro Comparative Evaluation. **EC Dental Science**, v.15, n.2, p.51-56, 2017.
- D'ALESSIO, P.A., *et al.* Oral administration of d-limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sci.* v.92, p.1151-1156, 2013.
- DEL FABRO, M. *et al.* Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions (Review) **The Cochrane Collaboration**, v. 10, p. 1-104, 2016.
- DEMIBURGA, S. *et al.* Effect of different gutta-percha solvents on the microtensile bond. **Clin Oral Investig**, v.21, n.2, p.627-633, 2017.
- DIAS, A. L. B. Chemical composition and *in vitro* inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* **Brazilian Journal of Biology**, v.80, n.2, p.460-464, 2020.
- DUAN, L., *et al.* Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities. **Food Chem.**, v. 234, p. 254–261, 2017.
- DUARTE, A., *et al.* Citrus as a componente of the mediterranean diet. **Journal of Spatial and Organizational Dynamics**, v.4, n.4, p. 289-304, 2016.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p. 446-452, 2006.
- DUGO, G., GIACOMO, A. D. **Citrus**. 1Ed., CRC Press, London, 2002.
- DUGO, P. *et al.* Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. **Flavour and fragrance journal**, v.26, p.34-46, 2011.
- DUMANI, A. *et al.* Polymerase chain reaction of *enterococcus faecalis* and *candida albicans* in apical periodontitis from Turkish patients. **J Clin Exp Dent**, V.4, N.1, P34-39, 2012.

- EL- HAWARY, S. S. Effect of certain essential oils on dissolution of three comercial gutta-percha brands. **Journal of essential oil bearing plants**. v.18, n.5, p.1126-1137, 2015.
- ELALFI, Z. A., *et al.* Essential oils from tropical medicinal herbs and food plants inhibit biofilm formation in vitro and are non-cytotoxic to human cells. **3 Biotech**. v.8, n.9, p.1-11, 2018.
- ELSON, C.E., *et al.* Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of dmba-induced rat mammary carcinogenesis. **Carcinogenesis**. V.9, p.331-332, 1988.
- ESTRELA, C. **Metodologia Cientifica**. 2Ed. Artes Médicas, 204
- ESTRELA, C. *et al.* Characterization of successful root canal treatment. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n.1, p.3-11, 2014.
- ESKES, C. *et al.* Proposal for a Brazilian centre on alternative test methods. **Altex**, v.26, p.295-298, 2009.
- EVRENDILEK, G.A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, p.35-41, 2015.
- FAO Citrus fruit fresh and processes statistical bulletin. **Food and agriculture organization of United nations**, 2021.
- FARAHMANDFAR, R. *et al.* Changes in chemical composition and biological activity of essential oil from Thomson navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) peel under freezing, convective, vacuum, and microwave drying methods. **Food Sci Nutr**. v.8, p.124-138, 2020.
- FARIA-JUNIOR, N. B. Effectiveness of Three Solvents and Two Associations of Solvents on Gutta-Percha and Resilon. **Braz Dent J**. v.22, n.1, p.41-44, 2011.
- FERREIRA, I. *et al.* New insight into the dissolution of epoxy resin-based sealers. **J. Endod**. v.43,n.9, p.1505-1510, 2017.
- FIEDMAN S *et al.* Considerations and concepts of case selection in the management of post- treatment endodontic disease ( treatment failure). **Endod Top**, v.1, p.54-78, 2002.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology** v.106, p.1346-1349, 2009.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. **British journal of biomedical Science**. v.66, n.4, p. 180-185, 2009.
- FRANÇA, S. M., *et al.*, Toxicity and repellency of essential oils to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) in *Phaseolus vulgaris* L. **Acta Amazonica**, v. 42, n.3, p.381-386, 2012.
- FRANCO, A.L.C., *et al.* Amazonian deforestation and soil biodiversity. **Conserv Biol**. v.33, n.3, p.590-600, 2019.

- FRASSINETI, S., *et al.* Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oils from Citrus spp. **Journal of Essential Oil Research**, v.23, n.1, p.27-31, 2011.
- FRIZZO, C.D.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of Southern Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.52, p. 3036-3041, 2004.
- GAUDIN, A.; TOLAR, M.; PETERS, O.A. Cytokine Production and Cytotoxicity of Calcium Silicate-based Sealers in 2- and 3-dimensional Cell Culture Models. **J Endod**, v.46, n.6, p.818-826, 2020.
- GARCIA, A. R., *et al.* Cytotoxicity and anti-Leishmania amazonensis activity of Citrus sinensis leaf extract. **Pharmaceutical biology**, v.55, n1, p.1780–1786, 2017.
- GERACI, A., *et al.* Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. **Natural Product Research**, v.31, n.6, p. 653-659, 2017.
- GERHARDT, C., *et al.* Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. **Braz. J. Food Technol.**, v. 4, p. 11-17, 2012.
- GETZ, K. D. *et al.* Prenatal and Early Childhood Exposure to Tetrachloroethylene and Adult Vision. **Children's health**, v.120, n.9, 2012.
- GOMES, F. A. *et al.* Efficacy of gutta-percha solvents used in endodontic retreatments. **RSBO**. v.10, n.4, p.356-361, 2013.
- GRELA, E.; KOZLOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**. v. 20, n. 4, p.303-311, 2018.
- GUEDES, O. A . *et al.* Effect of gutta-percha solvents on fiberglass post bond strength to root canal dentin. **Journal of Oral Science**, v. 56, n. 2, p.105-112, 2014.
- GUIMARÃES, M. V. *et al.* Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Rev. bioét.**, v.24, n.2, p.217-224, 2016.
- GUYTON, K. Z. *et al.* Human Health Effects of Tetrachloroethylene: Key Findings and Scientific Issues. **Environmental Health Perspectives**, v.122, n.4, p. 325-334, 2014.
- HAAG, J.D., *et al.* Limonene-induced Regression of Mammary Carcinomas. **Cancer Res.**, v.52, p.4021-4026, 1992.
- HAAS, M. Endodontia com pensamento pandêmico: dicas e considerações. São Paulo, 05 de out. 2021. Disponível em: <https://www.novaendovita.com/endodontia-com-pensamento-pandemico-dicas-e-consideracoes-clinicas/>. Acesso em: 05 de outubro de 2021.
- HERNANDEZ, J. M.,*et al.* Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis. **Molecules**. v.21, p.1-21, 2016.
- HOUSNA, A. B., *et al.* Characterization of essential oil from Citrus aurantium L. Flowers: Antimicrobial and Antioxidant Activities. **Journal of oleo Science**, v.61, n.10, p.763-772, 2013.

- HUANG, X. *et al.* Quantitative Evaluation of Debris Extruded Apically by Using ProTaper Universal Tulsa Rotary System in Endodontic Retreatment. **JOE**, v.33, n.9, p.1102-1105, 2007.
- HUNG, W.L., Suh, J.H., Wang, Y., Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. **J. Food Drug Anal.**, v.25, p.71–83, 2017
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. **International Agency for Research on Cancer**, Suppl. 7.; p. 152-154, Geneva, Switzerland: 1987.
- INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISSO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices: part 5: test for cytotoxicity. Geneve, 2009. 7p.
- ISFAQ, M. *et al.* Antioxidant and Wound Healing Potential of Essential Oil from Citrus reticulata Peel and Its Chemical Characterization. **Curr Pharm Biotechnol**, v.22, n.8, p.1114-1121, 2021.
- JAIN, M. *et al.* Influence of Ultrasonic Irrigation and Chloroform on Cleanliness of Dentinal Tubules During Endodontic Retreatment-An Invitro SEM Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.9, n.5, p.11-15, 2015.
- JIANG, M. H., *et al.* Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by 3 methods from the bud of Citrus aurantium L. var. amara Engl. **J Food Sci**, v.76, n.9, p.C1219-C1225, 2011.
- KARATAS, E. *et al.* The effect of chloroform, orange oil and eucalyptol on root canal transportation in endodontic retreatment. **Australian Endodontic Journal**, n.42, p.37-40, 2016.
- KAYAHAN, Z. O. *et al.* Influence of Post Space Preparation on the Apical Leakage of Calamus, Single-Cone and Cold Lateral Condensation Obturation Techniques: A Computerized Fluid Filtration Study. **Journal of Prosthodontics**, v.28, n.5, p.587-591, 2017.
- KEERTHANA, T. *et al.* An Invitro Cytotoxic Analysis of Citrus Sinensis ( Sweet Orange) as Root Canal Irrigant on Fibroblast Cells. **Annals of R.S.C.B**, v. 25, n.5, p.3561 – 3569, 2021.
- KHALLEF, M., *et al.* Ames and random amplified polymorphic DNA tests for the validation of the mutagenic and/or genotoxic potential of the drinking water disinfection by-products chloroform and bromoform. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 53, n. 2, p.154-159, 2018.
- KHEDMAT, S. *et al.*, Effect of chloroform, eucalyptol and Orange oil solvents on the microhardness of human root dentin. **Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences**, v.12, n.1, p.25-30, 2015.
- KUO, P. C. *et al.*, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Constituents from the Peels of Citrus grandis. **Molecules**, v.22, p.1-11, 2017.
- KUMAR, P. *et al.* Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protocols**. pag. 469-471, 2018.

- KUMAR, J *et al* Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. **Journal of International Oral Health**. v.7, n.2, p.42-45, 2015.
- KUMAR, D. Underutilized Citrus sp. Pomelo (*Citrus grandis*) and Kachai lemon (*Citrus jambhiri*) exhale in phytochemicals and antioxidant potential. **J Food Sci Technol**, v.56, n.1, p.217-223, 2019.
- KUMAR, K,J. *et al*. Geranium and Lemon Essential oils and Their Active Compounds Downregulate Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain, in Epithelial Cells. **Plants**, v.9, p.1-12, 2020.
- LASH, L.H. Environmental and genetic factors influencing Kidney toxicity. **Semin Nephrol**, v.39, n.2, p.132-140, 2019.
- LASKE, M. *et al*. The differences between three performance measures on dental restorations, clinical success, survival and failure: A matter of perspective. **The Academy of Dental Materials**. v.35, p. 1506-1513, 2019.
- LEE, R.H. *et al*. Esculetin exerts anti-proliferative effects against non-small-cell lung carcinoma by suppressing specificity protein 1 in vitro. **Gen. Physiol. Biophys**. V.36, p. 31-39, 2017.
- LIN, X. *et al*. The Chemical Compositions, and Antibacterial and Antioxidant Activities of Four Types of Citrus Essential Oils. **Molecules**. v.26, p.1-12, 2021.
- LIU, *et al*. Study on essential oils from four species of Zhishi with gas chromatography–mass spectrometry. **Chemistry Central Journal**, p.8-22, 2014.
- LOPES, V. N.; PACAGNAN, M. N., Marketing verde e práticas socioambientais nas indústrias do Paraná, **R.Adm.**, v.49, n.1, p.116-128, 2014.
- LOTA, M. L. *et al*. Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. **Flavour and fragrance journal**, n.16, p.89-96, 2001.
- LOU, Z. *et al*. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. *var. sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**, n. 80, p.371-377, 2017.
- LUO, Y. S., *et al*. Using Collaborative Cross Mouse Population to Fill Data Gaps in Risk Assessment: A Case Study of Population-Based Analysis of Toxicokinetics and Kidney Toxicodynamics of Tetrachloroethylene. **Environmental Health Perspectives**, v.127, n.6, p.1-10, 2019.
- JANTARAT, J.; MALHOTRA, W.; SUTIMUNTANAKUL, S. Efficacy of grapefruit, tangerine, lime, and lemon oils as solvents for softening gutta-percha in root canal retreatment procedures. **Journal of investigative and Clinical Dentistry**, v.4, p.60-63, 2013.
- JIANG, M. H. *et al*. Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by 3 methods from the bud of *Citrus aurantium* L. *Var. Amara* Engl. **Journal of food Science**, v.76, n.9, p.1219 – 1225, 2011.



- MACEDO, J.A.B., **Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde contribuição para profissionais prescritores**. 2016. Monografia pós-graduação, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2016.
- MAGALHÃES, B. S. *et al.* Dissolving efficacy of some organic. **Braz. Oral Res.** v.21, n.4, p.303-307, 2007.
- MARTELLI, F., NUNES, F. M.. F. Radicais livres: Em busca do equilíbrio **Cienc. Cult.**, v.66 n.3, p. 54-57, 2014.
- MARTINS, A. P. *et al.* Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISSO. **Revista de Fitoterapia**, v.11, n.2, p.133-145, 2011.
- MARTINS, M.H.G. Schistosomicidal effects of the essential oils of *Citrus limonia* and *Citrus reticulata* against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & biodiversity**, v.14, p.1-8, 2017.
- MARTOS, J. *et al.* Dissolving efficacy of eucalyptus and orange oil, xylol and chloroform solvents on different root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 44, p.1024-1028, 2011.
- MEERAN, M.F.N. *et al.* Can limonene be a possible candidate for evaluation as an agent or adjuvante against infection, immunity, and inflammation in COVID-19? **Helyon**. v.7, n.1, 2020.
- MEDEIROS, L. C. Toxicological aspects of trihalomethanes: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019.
- MENEZES-FILHO, A. C. P. *et al.* Avaliação química e atividades antifúngica e antioxidante dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de citrus limonia osbeck. (limão-china). **Global Science and Technology**, v.3, n.3, p. 1-11, 2020.
- MERLADETE, A. Brasil é o maior produtor de frutas cítricas. 25 de agosto de 2021. Disponível em: [https://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-e-o-maior-produtor-de-frutas-citricas\\_454978.html](https://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-e-o-maior-produtor-de-frutas-citricas_454978.html). Acesso em: 23 de outubro de 2021.
- MINTIGUEGUIAGA, *et al.* Compuestos aromaticamente activos del aceite esencial de *Citrus deliciosa* Tenore var. cai detectados por cromatografia gaseosa olfatométrica. **Journal of pharmacy & pharmacognosy reasearch**, v.5, n.6, p. 335-344, 2017
- MONSEF-ESFAHANI, H.R. *et al.* GC/MS analysis of *Citrus aurantium* L. hydrolate and its comparison with the comercial samples. **Iranian jornal of pharmaceutical**, v.3, p. 177-179, 2004.
- MORAES, T.M., *et al.* Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chem. Biol. Interact.** v.180, p.499-505, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: appication to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**. v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
- MUHLEN, C.V. Indices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**. v.1, n.3, p.21-29, 2009.

- MUNOZ, J. E., *et al.* In vitro and in vivo inhibitory activity of limonene against diferente isolates of *Candida* spp. **Journal of Fungi**. v.6, p.1-12, 2020.
- MURALI, R., KARTHIKEYAN, K.; SARAVANAN, R. Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidante enzymes in stretozotocin-induced diabetic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.112, p. 175-181, 2013.
- MUSHTAQ, M. *et al.* The Dissolving Ability of Different Organic Solvents on Three Different Root Canal Sealers: In Vitro Study. **Iranian Endodontic Journal**, v.7, n.4, p.198-202, 2012.
- NAIR, S. A. *et al.* Citrus peels prevent câncer. **Phytomedicine**, v.50, p.231-237, 2018.
- NAJAR, B.; SHORTREDE, J.E.; PISTELLI, L.; BUHAGIAR, J. Chemical Composition and in Vitro Cytotoxic Screening of Sixteen Commercial Essential Oils on Five Cancer Cell Lines. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, p. 1-10, 2020.
- NAWAZ, R., *et al.* Impact of climate variables on fruit internal quality of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *Citrus deliciosa* Tenora) in ripening phase grown under varying environmental conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 265, 2020.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
- NEELAKANTAN, P. N., Biofilms in Endodontics – Current Status and Future Directions. **Internationa Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1-21, 2017.
- NG, Y. L.; MANN, V.; GULABIVALA, K. Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature. **International Endodontic Journal**, v. 41, p.1026-1046, 2008.
- NIDH, P., *et al.* Synergistic potential of citrus aurantium L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 1-10, 2020.
- OIKEH, E. I. *et al.* Evaluation of the Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Oil and Non-Oil Extracts of Citrus sinensis (L.) Osbeck Seeds. **Prev. Nutr. Food Sci.** v.25, n.3, p.280-285, 2020.
- OLIVEIRA, A. C. M. *et al.* Emprego do óleo de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev Bras PI Med.** v.13, n.4, p.492-496, 2011.
- OLIVEIRA, G.L.S. D eterminação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. PI. Med.**, v.17, n.1, p.36-44, 2015.
- ONYEYIRICHI, I., *et al.* Evaluation of chemical constituent of Citrus medica limoum leaf essential oil. **Journal of Pharmaceutical and Scientific innovation**, v. 3, n.4, p.306-309, 2014.

- Ou, M. C. *et al.* The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. **Evid Based Complement Alternat Med.** p.1- 9, 2015.
- Oyama KON, Siqueira EL, Santos M. Ação de diferentes solventes sobre os cones de guta percha. **ECLER Endod.** v.1, n.3, 1999.
- OYEDEJI, A. O. *et al.* Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobrunchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.168, 2020.
- PALHAIS, M. *et al.* Influence of solvents on the bond strength of resin sealer to intraradicular dentin after retreatment. **Braz. Oral Res**, v.31, n.11, 2017.
- PATEL, M. *et al.* Limonene-induced activation of A<sub>2a</sub> adenosine receptors reduces airway inflammation and reactivity in a mouse modelo f asthma. **Purinergic Signal**, v. 16, n.3, p. 415-426, 2020.
- PEREIRA, R.S., *et al.* Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. **Anaerobe**, v.48, p.12-18, 2017.
- PICCINELLI, A.C., *et al.*, Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1<sub>α</sub> and protein expression. in spinal cord of mice. **Life Sci.**, v.174, p.28-34, 2017.
- Polti S., Mejora del tamaño de fruta y control de la alternancia en mandarina "Montenegrina" (*Citrus deliciosa* Tenore). 2013. Tesis de grado. Universidad de la República, 2013.
- PRADA, I. *et al.* Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Journal section: Oral Medicine and Pathology**, v.24, n.3, 2019.
- PRESGRAVE, O. *et al.* A proposal to establish a brazilian center for validation of altenative methods (BraCVAM). **ALTEX**, p.47-51, 2010.
- PRESGRAVE, O.A.F. *et al.* The need for establishment of brazilian centre for the validation of alternative methods (BraCVAM). **ATLA**, v.36, p.705-708, 2008.
- RAKHIT, M. *et al.* Antioxidantstrategies to overcome OS *In: IVF-Embryo transfer.* In: Agarwal A, Aziz N, Rizk B (eds). *Studies on women'shealth. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice.* Totowa:Humana Press; 2013. p. 237-62
- RAJARAM, S. *et al.* Influenza vaccines: the potential benefits of cell-culture isolation and manufacturing. **Ther Adv Vaccines Immunother**, 2020.
- RAMOS, T. I. F., CAMARA, A. C., AGUIAR, C. M. Evaluation of Capacity of Essential Oils in Dissolving ProTaper Universal Gutta-Percha points. **Acta Stomatol Croat**, v.50, n.1, p.128-133, 2016.
- REDA, S. Y., *et al.*, Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia osbeck*) e limão siciliano (*Citrus limon*) um resíduo agroindustrial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.4, p.672-676, 2005.

- REHMAN, K.; KHAN, F.R.; AMAN, N. Comparison of Orange Oil and Chloroform as GuttaPercha Solvents in Endodontic Retreatment. **The Journal of Contemporary Practice**. v.14, n.3, p.478-482, 2013.
- RHEDER, D. T. Synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Althaea officinalis* as reducing agent: evaluation of toxicity and ecotoxicity. **Scientific reports**, v.8, .12397, p.1-11, 2018.
- RIBEIRO, D. A.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. In Vitro Cytotoxic and Non-Genotoxic Effects of Gutta-Percha Solvents on Mouse Lymphoma Cells by Single Cell Gel (Comet) Assay. *Braz Dent J.*, v.17, n.3, p.228-232, 2006.
- RIBEIRO, D. A. *et al.* Biocompatobolity og gutta-percha solventes using in vitro mammalian test-system. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n.5, p.e106-e109, 2007.
- RIBEIRO, D. A. *et al.* Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.105, n.2, p.251-256, 2008.
- ROBERTO, D., *et al.* Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulation and cell proliferation. **Basic Clin. Pharm. Toxicol.**v.106, p.38-44, p. 2010.
- ROSA, R. A. *et al.* Eficiência dos solventes de guta percha usados na reintervenções endodônticas. Revisão de Literatura. **Revista virtual de odontologia**, v.1, p.2-5, ano 2007.
- SALEEM, M.; SAEED, M. T. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King saud university**, v.32, p.805-810, 2020.
- SANTOS, M.C.; TESSER, C. D. Um método para a implantação e promoção de acesso às Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Primária à Saúde. **Ciência e saúde coletiva**, v17, n.11, p.3011-3024, 2012.
- SAHIN, S. A novel technology for extraction of phenolic antioxidants from mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) leaves: Solvent-free microwave extraction. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p.950–957, 2015.
- SARROU, E. *et al.* Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *citrus aurantium L.* growing in Greece. **Molecules**, Basel, v.18, n.9, p. 10639-10647, 2013.
- SCELZA, In vitro evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. **OOOOE**. v.102, n.3, p.24-27, 2006.
- SCOTT, W. E.; MARSHALL, J.G.; BAUMGARTNER, C. The antimicrobial effect of chloroform on *Enterococcus faecalis* after gutta-percha removal. **J. Endod.** v.32,n.12,p.1185-1187, 2006.

- SELENIUS, L. A. *et al.*, The Cell Culture Medium Affects Growth, Phenotype Expression and the Response to Selenium Cytotoxicity in A549 and HepG2 Cells. **Antioxidants (Basel)**, v.8, n.5, 2019.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 3, n.4, p.177-199, 2004.
- SIQUEIRA, J. F., Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.90, p.647-650, 2000.
- SILVA, G. K. F. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares: trajetória e desafios em 30 anos do SUS. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 30, n.1, p.1-25, 2020.
- SILVA, S. *et al.* Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zingiberofficinale*, *Citrus aurantium bergamia*, and *Copaifera officinalis* Alone and in Combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. **BioMed Research International**, p. 1-7, 2019.
- SHEMESH, H. *et al.* Damage to Root Dentin During Retreatment Procedures. **Journal of Endodontics**, v.37, n.1, p.63.66, 2011.
- SHEN, C. Y. *et al.* Anti-inflammatory effect of essential oil fro *Citrus aurantium L. var. amara* Engl. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.65, p. 8586-8594, 2017.
- SHEN, C.Y, et al. Various Antioxidant Effects Were Attributed to Different Components in the Dried Blossoms of *Citrus aurantium L. var. amara* Engl. **J. Agric. Food Chem.** v.65, p.6087–6092, 2017.
- SHEN, C.Y. *et al.* Potent roles of dietary flavonoids from *Citrus aurantium L. var. amara* Engl. in atherosclerosis development. **Food e function**, v.11, n.1, p.561-571, 2020.
- SOARES, C. J. *et al.* How biomechanics can affect the endodontic treated teeth and their restorative procedures? **Braz. Oral. Res.**, v. 32, n.76, p.169-183, 2018.
- SOARES, D. P. *et al.* Política nacional de práticas integrativas e complementares em saúde: discurso dos enfermeiros da atenção básica. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, 2019.
- SOMMELLA, E. *et al.* Flavonoid Composition of Tarocco (*Citrus sinensis L. Osbeck*) Clone "Lempso" and Fast Antioxidant Activity Screening by DPPH-UHPLC-PDA-IT-TOF. **Phytochem Anal**, v. 28, n.6, p. 521-528, 2017.
- SONBOL F, Ibrahim SM, Mohamed BM. Antimicrobial activity of oil of bitter orange. **Alexandria J Pharm Sci**, v.9, n.2, p.107-109, 1992.
- SOUSA, M. P. *et al.* Influência do Magnésio e Cálcio no estresse oxidativo na Obesidade. **Research, Society and Development**, v. 9, n.1, 2020.

- SOUZA, R.R. *et al.* Dificuldades de remoção do cimento biocerâmico no retratamento endodôntico: revisão de literatura. **Revista Catedral**, v.3, n.3, p.28-36, 2021.
- SUNTAR, I. *et al.* An Overview on Citrus aurantium L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. **Oxid Med Cell Longev**, p.1-11, 2018.
- SREEJAYAN, N., *et al.* Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittelforschung**, v.46, n.2, p.169-172, 1996.
- SWIMBERGHE, R. C. D. *et al.* Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. **International Endodontic Journal**, v.52, p.604-628, 2019.
- TANOMARU-FILHO, M. *et al.* Solvent Capacity of Different Substances on Gutta-Percha and Resilon. **Braz. Dent. J.**, v.21, n.1, p.46-49. 2010.
- TAMSE, A. *et al.* Gutta percha solvents: a comparative study". **Journal of Endodontics**, v.12, n.8, p.337-339, 1986.
- TAO, N. G.; LIU, Y.; ZHANG, M. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1281-1285, 2009.
- TIAN, D. *et al.*, Coumarin Analogues from the Citrus grandis (L.) Osbeck and Their Hepatoprotective Activity. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.67, p.1937-1947, 2019.
- TIRADO, C. B. *et al.* Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.697, p.501-513, 1995.
- TRAPASSOS, C. C., *et al.* Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. **Colloids Surf. B Biointerfaces**. v.112, p.548-553, 2013.
- TREMELLEN K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. **Hum Reprod Update**. v.14, n.3, p.243-258, 2008.
- TREVISAN, L. *et al.* The Efficacy of Passive Ultrasonic Activation of Organic Solvents on Dissolving Two Root Canal Sealers. **Iranian Endodontic Journal**, v.12, n.1, p.25-28, 2017.
- TSAI, M. L. *et al.* Composition and Bioactivity of Essential Oil from Citrus grandis (L.) Osbeck 'Mato Peiyu' Leaf. **Molecules**, v.22, p1-19, 2017.
- TU, N.T. *et al.* Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. **Flavour and fragrance journal**, v. 17, p. 169-174, 2002.
- VAJRABHAYA, L. *et al.* Cytotoxicity evaluation of gutta-percha: Chloroform and GP-Solvent (limonene). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.98, n.6, p.756-759, 2004..
- VERMA, P. *et al.* Hazards of improper dispensary: Literature Review and report of an accidental chloroform injection. **Journal of Endodontics**, v.44, n.6, p-1042-1047, 2018.

- VIDAL, M. F. Produção comercial de frutas na área de atuação do BNB. **Caderno Setorial ETENE**, n.168, p.1-4, 2021.
- VIOLA, N. V., OLIVEIRA, A.C.M.; DOTTA, E.A.V. Ferramentas automatizadas: o reflexo da evolução tecnológica na Odontologia. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.68, n.1, p. 76-80, 2011.
- VITALI, F. C. Eficácia do hipoclorito de sódio com surfactante na desinfecção de cones de guta-percha e análise de alterações superficiais em MEV. 2015, Trabalho de Conclusão de Curso de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- VITTOZZI, L. et al. Comparative characterization of CHCl<sub>3</sub> metabolism and toxicokinetics in rodent strains differently susceptible to chloroform-induced carcinogenicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.8, p.103-110, 2000.
- VILLA-RUANO et al. Volatile profiling, insecticidal, antibacterial and antiproliferative properties of the leaf essential oil of *Bursera glabrifolia*. **Chem. Biodivers**, v. 15, n.11, p.1-13, 2018.
- VITURELLE, R. *et al.*, In Vitro Evaluation of Essential Oils Derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Biochem Res Int**, p.1-9, 2017.
- WANG, L.; LI, X.; CEN, C. 3-methyladenine attenuates chloroform-induced hepatotoxicity via autophagy activation. **Biomedical Research**, v.39, n.2, p.87–94, 2018.
- WELCH, A. A. *et al.* Cross- Sectional Associations Between Dietary Antioxidant Vitamins C, E and Carotenoid Intakes and Sarcopenic Indices in Women Aged 18–79 Years. **Calcif Tissue Int.** v.106, n.4, p.331-342, 2020.
- WENNBERG A. and ORSTAVIK D. Evaluation of alternatives to chloroform in endodontic practice. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.5, n.5, p.234-243, 1989.
- WASHIO, A. *et al.* Bioactive Glass-Based Endodontic Sealer as a Promising Root Canal Filling Material without Semisolid Core Materials. **Materials (Basel)**, v.12, n.23, p.3967, 2019.
- XU, D. *et al.* Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. **Molecules**, v.14, p.1-15, 2019.
- YADAV, H.K., *et al.* The effectiveness of eucalyptus oil, orange oil, and xylene in dissolving different endodontic sealers. **Journal of Conservative Dentistry**, v.19, n.4, p. 332-337, 2016.
- YANG, C. *et al.* Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel. **Molecules**, p. 22, p.1-10, 2017.
- YOO, Z.W.; KIM, N.; LEE, D. Comparative Analyses of the Flavors from Hallabong (*Citrus sphaerocarpa*) with Lemon, Orange and Grapefruit by SPTE and HS-SPME combined with GC-MS. **Bull. Korean Chem. Soc**, v. 25, n. 2, 2004.

YOUSUF, W.; KHAN, M.; SHEIKH, A. Success rate of overfilled root canal treatment. **J Ayub Med Coll Abbottabad**, v.27,, n.4, 2015. **Neurotox Res.**, v.34, n.3, p.353-362, 2018.

YU, L. *et al.* Systematic Detection and Identification of Bioactive Ingredients from Citrus aurantium L. var. amara Using HPLC-Q-TOF-MS Combined with a Screening Method. **Molecules** **2020**, v.25, n.2, p.1-15, 2020

YU, X.; YAN, J.; SUN, Z. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. **Onco. Targets. Ther.** v.11, p.1833–1847, 2018.

ZHANG, H., *et al.* Comprehensive comparative analysis of volatile compounds in citrus fruits of different species. **Food Chem.** v.230, p.316–326, 2017.

ZHANG, L. *et al.* The necessity for standardization of glioma stem cell culture: a systematic review. **Stem Cell Research & Therapy**, v.11, n.1, p. 1-7, 2020.

ZHENG, X. *et al.* Bilateral Olfactory Mucosa Damage Induces the Disappearance of Olfactory Glomerulus and Reduces the Expression of Extrasynaptic  $\alpha 5$ GABAAR in the hippocampus in early postnatal sprague dawley rats.

ZUBIZARRETA-MACHO, A. *et al.* Endodontic re-treatment and restorative treatment of a dens invaginatus type II through new Technologies. **Journal section: Prosthetic Dentistry**, v.11, n.6, p.570-576, 2019.