

FERNANDO TADEU TAVARES FERNANDEZ

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DO MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) NA POLPA
DENTÁRIA EXPOSTA E COM VITALIDADE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F363e
2016 Fernandez, Fernando Tadeu Tavares, 1977-
 Efeito do óleo essencial do manjerição (*Ocimum basilicum*
 L.) na polpa dentária exposta e com vitalidade em camundongos
 / Fernando Tadeu Tavares Fernandez. – Viçosa, MG, 2016.
 v, 28f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.23-28.

1. Odontologia veterinária. 2. *Ocimum basilicum* - Análise.
3. Manjerição -  leos vegetais. 4. Polpa dentária. 5. Fitoterapia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.08976

FERNANDO TADEU TAVARES FERNANDEZ

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DO MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) NA POLPA
DENTÁRIA EXPOSTA E COM VITALIDADE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 8 de julho de 2016

Leandro Licursi De Oliveira

João Paulo Viana Leite

Emily Correna Carlo Reis
(Coorientadora)

Fabrcio Luciani Valente
(Coorientador)

Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edelmiro e Nancy, e minhas irmãs Ana e Lu, por todo amor, carinho e ensinamento que me foi dado durante a vida.

À minha companheira de estrada Thaís e minha filha Gabriela, minhas princesas, que eu amo muito e que sempre me apoiaram e me deram todo amor do mundo.

À professora Andréa pelos ensinamentos, confiança e paciência dedicados a mim.

À professora Emily e ao professor Fabrício por toda conversa e apoio que me deram.

À professora Silvia e ao professor Leandro por toda ajuda e “salvamentos”

Aos professores João Paulo do Departamento de Bioquímica e Sérgio do Departamento de Química por me apresentarem ao Universo Fitoquímico da UFV.

À Alessandra, do Entre-Folhas, por permitir a utilização das plantas para a realização do experimento.

Aos técnicos, Adão do Departamento de Veterinária e ao Zé do Departamento de Química, por toda atenção e dicas importantes.

A todos os funcionários, alunos e pós-graduandos com quem eu pude conviver nesse período.

Ao Cnpq, pelo auxílio fornecido durante esses dois anos.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Ocimum basilicum</i> L. (Manjeriço)	3
2.2 Estrutura dentária	4
2.3 Diagnóstico e tratamento endodôntico	5
3 MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> L.	7
3.2 Cromatografia	8
3.3 Citotoxicidade	8
3.4 Grupos Experimentais	9
3.5 Procedimentos anestésico e cirúrgico	9
3.6 Coleta e processamento dos dentes	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5 CONCLUSÃO	22
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	24

RESUMO

FERNANDEZ, Fernando Tadeu Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Efeito do óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) na polpa dentária exposta e com vitalidade em camundongos**. Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Fabrício Luciani Valente e Emily Correna Carlo Reis.

A afecção endodôntica refere-se à pulpite ou necrose parcial ou total dos tecidos pulpare. Dependendo da gravidade da lesão, ela pode ser reversível, e nesse caso, são utilizados tratamentos que visam manter a integridade da polpa como proteção realizada direta ou indiretamente sobre a polpa. Com o objetivo de avaliar que capacidade do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Manjeriço), em reduzir as resposta inflamatória da polpa dentária em camundongos sem afetar seu processo de reparação, desenvolveu-se essa pesquisa. Para tal foi extraído 1 ml de Óleo Essencial, por hidrodestilação. Em seguida foram avaliadas a sua composição através da cromatografia (CG/MS) e sua citotoxicidade em culturas celulares HKE 923. Para avaliar sua ação nos processos inflamatórios pulpare *in vivo*, com vitalidade pulpar presente, acessos ao canal pulpar foram realizados na face oclusal dos primeiros dentes molares maxilares utilizando a caneta de alta rotação nº21 com refrigeração ar/água intermitente. No terceiro e oitavo dia, após o tratamento, os animais sofreram eutanásia e seus dentes foram processados e avaliados histologicamente. Os principais componentes encontrados no óleo essencial de *O. basilicum* foram os monoterpenos, Linalol (20,21%), 1-8 Cineol (18,03%), Cânfora (13,03%), e o fenilpropanóide, Eugenol (11,84), que juntos, representaram 63,11% da constituição química total. A no estudo *in vitro* a citotoxicidade foi elevada, mesmo em diferentes concentrações, levando a hipótese de que isso poderia afetar a recuperação pulpar levando-a a necrose. Mas o que ocorreu no estudo *in vivo* mostrou que a intensidade da lesão foi menor quando foi utilizado o óleo reduzindo a intensidade e da extensão do processo inflamatório. Foram observadas alterações do tecido mole, como hiperemia e a degeneração odontoblástica em ambos os grupos, entretanto, essas reações foram menores nos animais tratados com óleo essencial de *O. basilicum*. Concluiu-se que o tratamento com óleo essencial é uma opção nos tratamentos da polpa dentária com vitalidade presente na medicina veterinária.

Abstract

FERNANDEZ, Fernando Tadeu Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2016. **Basil essential oil effect (*Ocimum basilicum* L.) on the exposed dental pulp and vitality in mice** Advisor: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-Advisors: Fabricio Luciani Valente and Emily Correna Carlo Reis.

The endodontic disease refers to partial or total pulpitis or necrosis of the pulp tissue. Depending on the severity of the injury, it can be reversible. In which case can be used treatments designed to maintain the integrity protection performed as pulp directly or indirectly on the pulp. This research was developed to assess the capacity of *Ocimum basilicum* essential oil (Basil) in reducing the inflammatory response of dental pulp in mice without affecting their repair process. Was extracted 1 ml essential oil by hydrodistillation. Next the composition was evaluated by chromatography (GC / MS) and its cytotoxicity in cell cultures HKE 923. To assess its influence on inflammatory processes in vivo pulp, with pulp vitality present, access to the pulp canal were performed on the occlusal surface of the first teeth maxillary molars using the high-speed handpiece at 35 with cooling air / water flashes. In the third and eighth day after treatment, the animals were euthanized and their teeth lining processed and evaluated histologically. The main components found in essential oil *O. basilicum* L. were monoterpenes, Linalool (20.21%), 1-8 Cineole (18.03%), camphor (13.03%), and phenylpropanoid, eugenol (11.84), which together represented 63.11% of the total chemical composition. Cytotoxicity was high even in different concentrations, leading to the hypothesis that it could affect the pulp recovery leading to necrosis. But what happened in the in vivo study showed that the intensity of the injury was not increased when we used the oil and caused no increase in the intensity and extent of the inflammatory process. Changes were observed soft tissue, such as hyperemia and odontoblastic degeneration in both groups, however, these reactions were lower in animals treated with essential oil of *O. basilicum*. It was concluded that treatment with the essential oil is an option in the treatment of dental pulp with vitality present in veterinary medicine.

1. INTRODUÇÃO

Nas afecções dentárias em que o dente é acometido por um traumatismo, como a fratura coronal, é importante manter a vitalidade da polpa (ROSA e MACEDO, 2003). Caso o tratamento não seja adequado, poderá agravar o quadro levando a formação de abscessos e necrose (TROPE, 2008) sendo necessária a realização de pulpotomia total. A gravidade da pulpíte e da necrose dos tecidos determinam a gravidade da lesão e, portanto se é reversível ou não (DE DEUS, 1992; NIEMIEC, 2008).

Na medicina veterinária a pulpíte está presente em processos isquêmicos, por avulsão ou tromboembolismo e nas lesões periodontais severas que podem acometer a polpa caso não sejam tratadas. Isso se deve a existência de vias de comunicação entre a polpa e o periodonto como os canalículos dentinários, os canais laterais e/ou acessórios e o forame apical (GORREL, 2010).

O tratamento endodôntico tem por objetivo o restabelecimento estrutural do canal dentário e seu sucesso depende da ausência de bactérias no sistema de canais radiculares e a não utilização de substâncias com alto poder citotóxico que poderiam desencadear ou manter uma inflamação nos tecidos perirradiculares (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

As plantas são fonte de novos compostos biologicamente ativos e com propriedades que podem ser utilizadas em diversas terapias na medicina veterinária. O óleo extraído delas, denominado óleo essencial (OE), tem sua origem no metabolismo secundário das plantas e possui uma composição química complexa (OLIVEIRA *et al.*, 2006) proporcionando uma variedade de compostos farmacologicamente ativos (CECHINEL FILHO, 1997).

Em humanos os óleos essenciais já são utilizados no tratamento endodôntico de maneira rotineira e o maior exemplo disso está na utilização intracanal do eugenol, extraído da espécie *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry popularmente conhecido como cravo-da-Índia.

A utilização do eugenol, associado ao hidróxido de zinco, nas obturações em cães foi estudada por Domingues-Falqueiro *et al.* (2007) que identificou sua superioridade contra agentes microbianos no tecido pulpar necrosado, no tratamento com eugenol e gutta-percha, em comparação ao tratamento somente com hidróxido

de cálcio. Entretanto, o eugenol, componente majoritário do óleo essencial de *S. aromaticum*, possui características citotóxicas e, principalmente, genotóxicas causando irritação dos tecidos periapicais, inflamação e necrose (STANKIEWICZ *et al.*, 2000).

A aplicação do OE de *Ocimum basilicum* L. durante a terapia endodôntica, quando existe exposição da polpa com vitalidade presente, pode acarretar a melhora da reparação pulpar, com menor ação citotóxica, possibilitando uma melhor resposta ao tratamento definitivo.

Nesse contexto o objetivo deste estudo foi analisar a composição química, avaliar a citotoxicidade e a ação na resposta inflamatória do OE de *O. basilicum* L. no processo de reparação da polpa dentária exposta com presença de vitalidade em camundongos. Isso trará informações sobre a oportunidade de introduzir um novo fármaco no tratamento endodôntico, incentivando uma nova possibilidade comercial para a produção de *O. basilicum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Ocimum basilicum* – Manjeriço

O *O. basilicum*, pertencente à família Lamiaceae, é uma erva anual que cresce em várias regiões do mundo (SAJJADI, 2006). A espécie está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas Central e do Sul, mas a África é considerada o principal centro de diversidade deste gênero (PATON, 1992). A espécie foi introduzida no Brasil durante a colonização europeia seguindo a rota de comércio de escravos (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 1998).

Por se tratar de uma planta que se desenvolve melhor em regiões de climas quentes e amenos (PEREIRA, 2011) e possuir rendimento razoavelmente alto na produção do seu OE, mostra boa possibilidade de cultivo e o torna uma boa fonte de renda para os agricultores, especialmente em países em desenvolvimento (RUNYORO *et al.*, 2010). Seu OE possui propriedades assépticas, digestivas, sedativas e analgésicas, sendo também utilizado na indústria de cosméticos em sabonetes, cremes e perfumes e na indústria de alimentos para fornecer aroma e sabor (GERMER, 1989).

O gênero *Ocimum* compreende em mais de 60 espécies, das quais o *O. basilicum* possui elevado valor econômico. Um número de diferentes quimiotipos de manjeriço (*O. basilicum*) foram identificados e sua classificação é feita de acordo com a concentração de seus diferentes componentes químicos com uso terapêutico licomo nalol, 1,8- cineol, eugenol, cânfora e também compostos tóxicos como chavicol, estragol e metil-eugenol (BASER e BUCHBAUER, 1989; SIMON *et al.*, 2015).

O linalol é um álcool monoterpênico, comumente encontrado como o maior componente dos óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas, algumas das quais são freqüentemente utilizadas na medicina tradicional possuindo propriedades analgésica e anti-inflamatória (ISMAIL, 2006). Outro componente é o 1,8-cineol, estudado por BASTOS (2009), onde se observou sua atividade broncodilatadora e anti-inflamatória na asma com capacidade miorelaxante e anti-inflamatória nas vias aéreas, pela diminuição da eosinofilia/neutrofilia, das citocinas pró-inflamatórias e da atividade da mieloperoxidase

O. basilicum possui baixas concentrações de eugenol quando comparado ao do *S. aromaticum*, que possui 90% de eugenol em sua composição, e essa alta concentração o torna um elemento citotóxico (HO *et al.*, 2006). Porém esse componente apresenta ação anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica. Possui ainda ação analgésica, pois promove bloqueio da condução nervosa de modo reversível ou não, dependendo da concentração (HUME, 1986).

As folhas do *O. basilicum* são popularmente utilizadas em afecções de pele, no controle dos níveis de açúcar no sangue, são antiespasmódicos e analgésicos, diminuem a pressão sanguínea, reduzem febre, além de ter ação bactericida, fungicida e anti-inflamatória (MATOS, 2000).

2.2. Estrutura Dentária

Os dentes, por desempenharem diversas funções como fonação, mastigação e armas de ataque e defesa, devem estar firmemente presos aos ossos (Figura 1a). A estrutura em si consiste no esmalte, que é um tecido duro, inerte e acelular produzido por células epiteliais e suportado pela dentina formada por tecido conjuntivo duro, menos mineralizado mais elástico que o esmalte, o qual é produzido e sustentado por um tecido conjuntivo frouxo (Figura 1b). Os dentes estão inseridos ao osso pelo tecido conjuntivo de suporte do dente que proporciona flexibilidade suficiente para resistir às forças da mastigação. Possui ainda um conjunto especializado de estruturas de suporte que consiste no osso alveolar, no ligamento periodontal e no cimento, todos protegidos pela gengiva (NANCI, 2013).



Figura 1: Representação esquemática da estrutura dentária do camundongo. (a) Inserção do primeiro molar (circulo) na maxila; (b) Corte longitudinal do dente e suas estruturas.

A polpa dentária (Figura 2) tem origem ectomesenquimal e possui células especializadas na produção de dentina, os odontoblastos. Também estão presentes fibroblastos, monócitos, macrófagos e linfócitos B e T, formando o restante de uma população variada de células do tecido pulpar, envolvidas na matriz extracelular. Devido ao íntimo relacionamento entre estas células e a dentina, podem-se considerar estes dois tecidos (polpa e dentina) como uma única entidade funcional, algumas vezes chamado complexo dentino-pulpar (COHEN e BURNS, 2000). Através do forame apical (Figura 2c) os vasos sanguíneos, vasos linfáticos, feixes nervosos, que possuem acesso à região pulpar (COHENCA *et al.*, 2013).

A polpa tem como função a produção da dentina que a circunda, a nutrição da dentina avascular, sua proteção e por meio da inervação, causa a sensibilização dessa dentina quando lesada. Por fim, tem a função de reparação, uma vez que ela é capaz de produzir nova dentina quando necessário (NANCI, 2013).

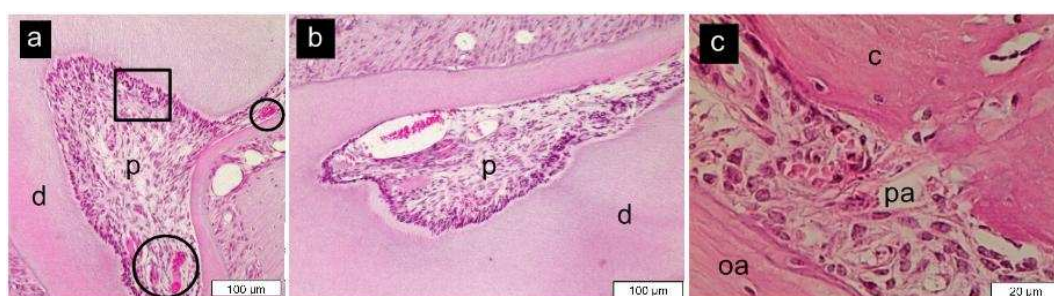


Figura 2: Estrutura normal da polpa coronal, radicular e periapical do camundongo. (a) Polpa Coronal, (b) Canal Radicular: dentina e (c) Região Periapical; dentina (d); polpa dentária (p); vasos sanguíneos (círculo); camada odontoblástica (quadrado); cemento (c); região periapical (pa); osso alveolar (ao).

2.3. Diagnóstico e Tratamento Endodôntico

O processo de reparação frente a agressões do complexo dentino-pulpar é variado, sendo influenciado principalmente pela extensão e pela duração do estímulo agressor. As respostas pulpares nesse processo foram descritas por Nanci (2013) sendo de duas formas, uma em resposta a agressões prolongadas e de início lento (cáries) e a outra de agressão grave e de início rápido (fraturas).

As pulpites, porém, podem ser classificadas como, reversíveis quando respondem favoravelmente a um tratamento preventivo e / ou conservador, ou

irreversíveis (aguda ou crônica), onde sob o ponto de vista clínico, já se supõe uma resposta desfavorável ao tratamento (DE DEUS, 1992).

De acordo com Cohenca *et al.* (2013) para que se tenha sucesso da terapia endodôntica, onde exista vitalidade pulpar, é importante reconhecer as condições dentárias ideais para reverter a lesão, visando a preservação da polpa e a prevenção contra a periodontite apical. Para isso é necessário, independente da terapia, que a polpa responda aos testes de sensibilidade, não tenha sinais de inflamação, não cause dor persistente ou espontânea e não exija extensas restaurações.

Essas condições determinam a terapia para proteção adequada da polpa sendo classificadas como, proteção direta ou capeamento pulpar direto, que consiste em proteger a polpa de contaminantes ambientais utilizando substâncias biologicamente compatíveis com a polpa e que auxiliem na cicatrização, preservando a vitalidade pulpar. A proteção indireta é utilizada nos casos de remoção somente da dentina infectada e necrosada e a pulpotomia parcial há remoção da polpa coronária (NIEMIEC, 2005).

Porém, em casos nos quais o dente é acometido por um traumatismo, como fratura coronal, nem sempre isto é possível (ROSA e MACEDO, 2003) e se não houver um tratamento adequado, poderá agravar o quadro levando a formação de abscessos e necrose (TROPE, 2008) sendo necessária a realização de pulpotomia total com posterior restauração.

As indicações e técnicas sobre os métodos de proteção dentinopulpar foram pesquisadas por Freires e Cavalcanti (2011), e concluíram que os materiais utilizados para esses procedimentos devem possuir como características: atividade antibacteriana, efeito remineralizante, previnam a microinfiltração marginal, selem os túbulos dentinários, isolamento térmico, químico e elétrico, sejam biologicamente compatíveis, estimulem a recuperação do tecido pulpar e auxiliem na neoformação de dentina.

Dos agentes anti-inflamatórios utilizados como medicação intracanal, os esteroides ou glicocorticoides são os mais estudados e utilizados, atuando sobre o ácido araquidônico e seus produtos (prostaglandinas e leucotrienos), na redução da vasodilatação, da permeabilidade vascular e da hipersensibilização do nociceptor,

inibindo ainda o edema, a dor e o efeito quimiotático dos leucócitos (REGINATO *et al.*, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do óleo essencial de *Ocimum basilicum*

Para a extração do OE foram coletados 500 gramas da parte aérea de *O. basilicum*, cultivados pelo Grupo “Entre-Folhas” da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O período da coleta foi entre 8:00 e 10:00 horas da manhã.

O material fresco foi encaminhado ao Laboratório de Biodiversidade da UFV para extração do OE utilizando o processo de hidrodestilação por arraste de vapor em um *Clevenger*, sendo este método ideal para extrações em pequena escala.

Para realizar essa extração, o material fresco foi parcialmente triturado e posteriormente foram adicionados 500 ml de água destilada. Essa mistura foi transferida para um balão de fundo chato e colocada sobre uma manta aquecedora.

O conteúdo do balão ao entrar em ebulição faz com que o óleo presente na planta evapore juntamente com os vapores de água. As substâncias voláteis são conduzidas ao condensador e posteriormente ao tubo de resfriamento. Devido a sua baixa densidade, o óleo essencial fica concentrado sobre a camada de água, podendo ser facilmente separados.

Após a extração, o OE obtido foi estocado em tubos de vidro âmbar, selados, em temperatura de cerca de 4 °C.

3.2. Análise química do OE

A análise química e a análise qualitativa do óleo essencial foi realizada no Departamento de Química da UFV empregando a técnica de cromatografia gasosa em um equipamento Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010, equipado com uma coluna capilar Supelco Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e acoplado a um detector seletivo de massa, operando com energia de ionização de 70 eV. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com a velocidade de 1,8 mL min⁻¹ e com a temperatura do injetor de 230°C. O programa de aquecimento foi iniciado a 40°C durante 2 minutos,

seguido de um aumento gradual a 240°C a uma velocidade de 3°C por minuto. Esta temperatura foi então mantida durante 10 minutos (LAGE *et al.*, 2015).

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os espectros de massa disponíveis no banco de dados do equipamento (biblioteca Willey e Nist) e pelo índice aritmético de retenção relativo (IA) à série de alcanos C₉-C₂₂ (ADAMS, 2007). A porcentagem relativa desses constituintes foi realizada pela integração da área dos cromatogramas de íons totais a partir da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas conforme Rosado *et al.* (2011).

3.3. Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células de linhagem eucariótica, HEK 293 (ATCC/CRL-1573) de rim embrionário humano. Estas células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco-Invitrogen), com suplementação de 10% de soro bovino fetal inativado (v/v) (Gibco-Invitrogen) em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. Estas células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 1x10⁵ células viáveis por poço em 100 µL de meio e 2,5% de soro bovino fetal (v/v). As placas permaneceram incubadas por aproximadamente 12 horas, para total aderência das células.

As amostras de OE foram ressuspensas em dimetilsulfóxido - DMSO (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL e diluídas em meio de cultura completo (3,5%, 7%, 15%, 30%, 60% e 100% de OE) e em seguida, adicionadas à cultura de celular.

Posteriormente, foram acrescentados 100 µL de extrato puro por poço ou das diluições, 1,75 (3,5%), 3,5 (7%), 7,5 (15%), 15 (30%), 30 (60%) e 50 mg/ml (100%) em quadruplicata, utilizando como controle meio solução 1% de Tween 20.

As placas permaneceram incubadas por 24 horas e então o sobrenadante foi retirado, para iniciar o ensaio de proliferação celular acrescentando 100 µL de solução estéril brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - MTT (Amresco®), na concentração de 0,5 mg/mL, por poço. A placa foi então incubada por 4 horas em estufa úmida, para total incorporação do corante pelas células viáveis em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e posteriormente

acrescentado 100 µL de isopropanol contendo HCl 0,1 mol/L e posteriormente a placa foi agitada por 10 minutos para total solubilização do corante. A absorbância referente a cada poço da placa foi determinada por espectrofotômetro em 540 nm no leitor de microplaca Biotrak II (Amersham Bioscience).

Para analisar o resultado da citotoxicidade foi utilizado o teste de comparação múltipla entre o grupo controle e as diferentes concentrações do OE sendo avaliados utilizando-se o one-way analysis of variance (ANOVA), e os pós-testes utilizando Boferroni e Tukey com nível de significância 5%. Utilizou-se o software GraphPad Prism® 5.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.

3.4. Grupos Experimentais

Para o estudo, foram utilizados 12 camundongos da espécie Swiss, com 8 semanas, fêmeas, com peso variando entre 25 – 30 g adquiridos no Biotério do Departamento de Medicina Veterinária (DVT). Durante o decorrer do experimento, os animais foram alojados com 4 animais em cada gaiola e alimentados com ração balanceada e água “ad libitum” até completarem os períodos experimentais. O estado geral dos animais foi avaliado diariamente. Foram seguidas rigorosamente as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, sendo a Médica Veterinária responsável a professora Andréa Pacheco Batista Borges (CRMV-MG 2772). O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV sob o processo nº 34/2015.

Para o experimento foram utilizados dois dentes de cada animal, os primeiros pré-molares maxilares, tanto do lado direito quanto do lado esquerdo, totalizando 24 dentes. Esses dentes foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de 12 dentes cada. O grupo tratado recebeu OE de *O. basilicum* e em seguida o hidróxido de cálcio e o grupo controle foi tratado apenas com hidróxido de cálcio.

3.5. Procedimento Anestésico e Cirúrgico

Os animais foram pré-anestesiados com a administração intraperitonal de diazepam (5 mg/Kg) e para indução e manutenção anestésica xilazina (15 mg/kg) e ketamina (150 mg/kg) pela mesma via.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal (Figura 3A), em seguida os molares foram expostos (Figura 3B) para realização da antisepsia oral, feita com a administração tópica com clorexidina.

Posteriormente foi realizado o acesso até a polpa dentária, através da face oclusal do dente (Figura 3C), utilizando uma broca cônica N° 21 (SS White®), acoplada a caneta (contra ângulo), de alta rotação Kavo, modelo Magno 604 C Borden, com refrigeração ar/água intermitentemente.

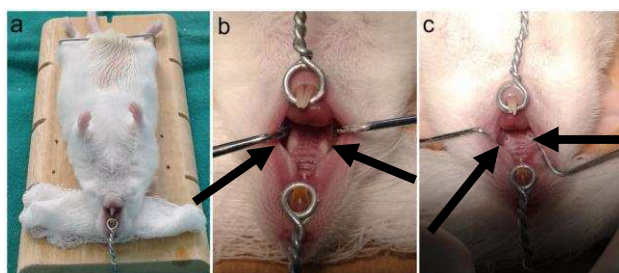


Figura 3: Posicionamento do animal, exposição dos dentes e acesso a polpa. (a) Animal anestesiado e em decúbito dorsal preparado para iniciar o procedimento, (b) Exposição dos primeiros molares (seta) e (c) Abertura da coroa dentária para início do tratamento (setas).

No grupo tratado, depois de realizado o acesso até a polpa, foi feita a aplicação de uma gota do OE de *O. basilicum* com o auxílio de uma seringa de 1 ml e um cateter nº 24. Decorrido um minuto foi introduzido o hidróxido de cálcio diretamente sobre o OE e para selar, de modo a evitar as microinfiltrações marginais, foi utilizado ionômero de vidro promovendo o isolamento à polpa tratada a fatores externos. No grupo controle somente foi realizado o capeamento direto com hidróxido de cálcio e em seguida aplicado o ionômero de vidro (Figura 4).

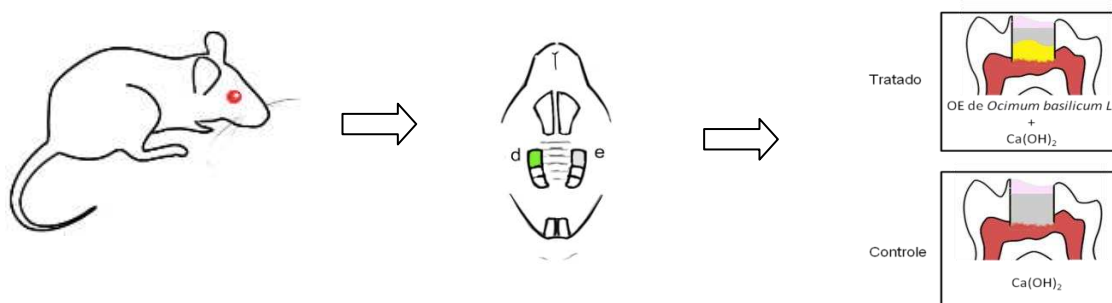


Figura 4. Representação esquemática dos dentes utilizados e do procedimento realizado nos grupos tratado e controle

3.6. Coleta e Processamento dos dentes

Após 3 dias do tratamento dois dentes (tratado e controle) de cada animal, de um grupo de 6 animais, foram coletados juntamente com o tecido periodontal circundante. O mesmo foi feito com mais 6 animais após 8 dias.

Para tal, os animais foram pré-anestesiados com diazepam (5 mg/Kg) e posteriormente foram administradas a xilazina (15 mg/kg) e a ketamina (150 mg/kg), todos administrados por via intraperitoneal. Em seguida, os animais sofreram eutanásia por deslocamento cervical e suas maxilas foram removidas. Com o bisturi, foi realizada uma pequena pressão sobre a linha média do palato duro, separando-o nos antimeros direito e esquerdo sendo, posteriormente, colocados separadamente em frascos contendo formol 10% durante 5 dias (Figura 5).

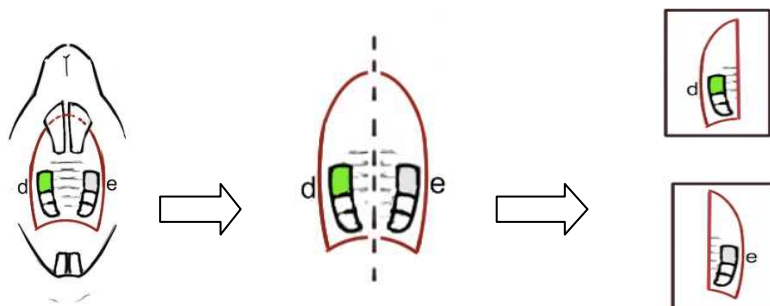


Figura 5: Representação esquemática da coleta do material utilizado para a análise histológica do grupo tratado e controle.

Após esse tempo, as peças, foram lavadas por 24 horas em água corrente e desmineralizadas com auxílio da solução de ácido fórmico a 5% e citrato de sódio, com troca da solução a cada 2 dias por 10 dias.

As peças foram novamente lavadas em água corrente por 24 horas, neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% por 24 horas, lavadas novamente em água corrente por mais 24 horas e imersas em álcool 70%. Em seguida foram desidratadas em álcoois de concentração crescente (álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto), diafanizadas em álcool-xilol, xilol e incluídas em parafina para confecção dos blocos e realização dos cortes em micrótomo rotatório LEIKA RM 22245®.

Foram, então, realizados cortes seriados longitudinais com 6 µm de espessura e posteriormente corados pela hematoxilina/eosina para ter uma visão geral da morfologia celular pulpar. Aos 8 dias de pós-operatório esse procedimento foi todo repetido em 6 animais de cada grupo.

A análise qualitativa dos parâmetros histológicos foi realizada com o emprego de microscópio óptico comum, onde cada um dos grupos foi descrito utilizando uma modificação dos critérios estabelecidos por Hasheminia *et al.* (2010) Esmeraldo *et al.* (2013). Foram utilizados parâmetros para avaliação do processo inflamatório (intensidade e extensão da inflamação) e para alterações do tecido mole (alterações da camada odontoblástica da resposta vascular) na polpa dentária.

O estágio do processo inflamatório foi classificado como de (1) fase aguda, quando houve a presença de mais de 80% de células polimorfonucleares, (2) fase mista ou de transição, quando a quantidade de células polimorfonucleares e células mononucleares estavam próximas, ou (3) crônica, onde mais de 80% das células eram mononucleares. A intensidade da inflamação foi determinada pela quantidade de células próximas ao local da lesão, no aumento 400x, e foi determinada como (1) discreta, com até 30 células inflamatórias, (2) moderada, com a presença de 30 a 60 células inflamatórias, ou (3) intensa, com mais de 60 células inflamatórias.

A extensão foi avaliada de acordo com a presença de células e do alcance dos eventos inflamatórios na polpa dentária sendo, (1) discreta, com maior presença de células inflamatórias próximas a região do material de capeamento, (2) moderada, onde existe mais de um terço do tecido pulpar com presença de infiltrado inflamatório e (3) extensa, com presença de infiltrado inflamatório difundido por toda polpa dentária e completa destruição da organização histológica normal do tecido pulpar.

A avaliação do tecido mole foi determinada avaliando a integridade da camada de células odontoblásticas podendo apresentar (1) moderada desorganização, proliferação e hiperatividade, (2) completa desorganização do tecido pulpar com ausência de proliferação, ou (3) necrose pulpar. Já a resposta vascular foi avaliada de acordo com o número de vasos hiperêmicos presentes por toda extensão da polpa dentária sendo classificada como (1) discreta, com a presença de vasodilatação de 1 a 3 vasos, (2) moderada presença de vasodilatação de 4 a 6 vasos, (3) grave, presença de vasodilatação de 7 ou mais vasos, e por fim (4) lesão vascular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método utilizado para a extração do OE mostrou-se adequado o suficiente para realizar o experimento. Para tanto 500 g parte aérea de manjeriço, envolvendo flores e folhas, proporcionando a obtenção de 1 ml do OE (0,2% de rendimento), de aspecto espesso, translúcido, apresentando aroma doce/picante e coloração verde-amarelada. Foi então realizada a análise química, avaliada a citotoxicidade e a avaliação de sua ação no processo inflamatório *in vivo*. Foram identificados 27 componentes no OE de *O. basilicum* e a porcentagem de cada um estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Constituintes químicos, classificação e suas respectivas porcentagens de concentração no OE de *O. basilicum* realizadas análise por GC/MS.

Grupo metabólico	Composto	% Área
Fenilpropanóides	Eugenol	11.84
Monoterpenos	Linalol	20.21
	1,8-Cineol	18.03
	Cânfora	13.03
	α -Terpineol	3.75
	β -Pineno	1.81
	Fenchona	1.25
	Terpineno-4-ol	1.05
	α -Pineno	0.95
	Canfeno	0.85
	β -Mirceno	0.83
	Sabineno	0.79
	2-Careno	0.56
	Terpineol- α	0.39
	Terpineno- γ	0.27
	Hidrato de trans-Sabineno	0.24
	Borneol	0.15
Sesquiterpenos	Germacreno D	6.09
	α -Cadinol	5.60
	β -Elemeno	2.27
	α trans-Bergamoneto	2.12
	Cariofileno- β	2.10
	Guaieno cis- β	1.85
	Naftaleno	1.37
	α -Humuleno	0.99
	Cubenol	0.87

Desses componentes, os constituintes majoritários foram linalol (20,21%), 1-8 cineol (18,03%), cânfora (13,03%) e eugenol (11,84%), que juntos, representam 63,11% de toda composição.

A ação anti-inflamatória do linalol descrita por Silva *et al.*, (2015) ocorre devido ao mecanismo inibidor da produção de leucotrienos. Sua propriedade antinociceptiva e anti-hiperálgica também foi citada por Peana *et al.*, (2004) que descreve sua ação no bloqueio de receptores das células nervosas.

Já o 1-8 cineol, conhecido também como eucaliptol, também tem ação anti-inflamatória relatada por Santos e Rao (2000), pois ele inibe a formação de prostaglandinas e citocinas pelos monócitos. O mesmo foi observado por Daniel *et al.*, (2009) em relação ao eugenol.

Os compostos minoritários do OE, entre 1% e 10% totalizaram 29,26% dos componentes presentes no OE. O restante, cada um com menos de 1%, foram considerados como traços, representando 7,63% da concentração total do óleo.

Quanto a análise citotóxica o gráfico 1 mostra a comparação do potencial citotóxico das diferentes concentrações do OE de *O. basilicum* com o grupo controle sendo os resultados obtidos através da análise de viabilidade celular.

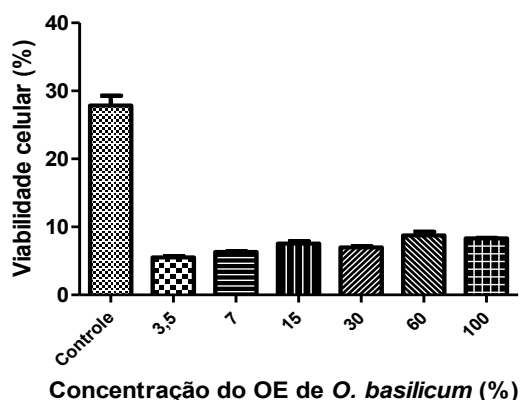


Gráfico 1: Resultado da viabilidade celular em diferentes concentrações do OE de *O. basilicum*.

Os resultados mostram que a diferença foi significativa entre os grupos, independente de sua concentração, e o grupo controle ($p < 0,05$). O OE reduziu a

viabilidade celular, em comparação ao grupo controle, essa característica foi descrita por Ho *et al.*, (2006).

Mesmo apresentando concentrações mais baixas de eugenol do que o *S. aromaticum* (ISMAIL, 2006), nesse experimento o OE mostrou-se citotóxico em todas as concentrações no estudo *in vitro*. De acordo com Bader (2006) Isso se deve a presença de alguns compostos presentes nas plantas, como os terpenos e polifenóis, que em seu estudo causar causaram hemólise dos eritrócitos.

Esse efeito citotóxico pode estar relacionado a danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY *et al.*, 2003). Essa ação também foi citada por Cavalcanti *et al.* (2011) em relação a atividade antimicrobiana, onde a interação desse produto natural e de seus fitoconstituintes com as membranas celulares levaria a alteração da da permeabilidade celular, ao desequilíbrio hidroeletrólítico e a lise de membrana, o que explicaria a resposta celular da polpa frente à ação do OE de *O.basilicum*.

A resposta inflamatória foi avaliada pela histologia e os resultados estão expressos no Quadro 2 que mostra as medianas dos escores de cada característica da resposta inflamatória em cada grupo estudado.

Quadro 2: Mediana dos critérios histológicos para avaliação da resposta inflamatória nos diferentes grupos analisados.

Variável mensurada	3 dias		8 dias	
	Tratado	Controle	Tratado	Controle
Fase inflamatória	2	3	3	3
Intensidade	2	2	2	3
Extensão	2	2	2	3
Hiperemia	2	3	2	3
Alteração da camada odontoblástica	1	2	2	2

Quanto ao tipo de inflamação, observou-se que o grupo tratado aos 3 dias apresentou características celulares envolvidas tanto no processo inflamatório agudo quanto no crônico, sendo caracterizado como um processo inflamatório misto (Tabela 2).

Um grande número de células inflamatórias estava presente na região da lesão, mas não se estendeu com a mesma intensidade para a região pulpar coronal

devido à presença de fragmentos de tecido duro decorrentes do procedimento realizado com a broca, debris celulares e proliferação fibroblástica. A necrose parcial foi notada em apenas um dente, localizada entre a polpa coronal e o início da porção radicular (Figura 6a).

Comparando com os achados de Cordeiro *et al.* (1985), utilizando somente o capeamento com hidróxido de cálcio, as irregularidades teciduais, as vacuolizações na polpa coronária e a presença de uma área de necrose próxima a área da lesão, com presença de infiltrado inflamatório e acentuada proliferação fibroblástica, são uma tentativa de isolar a área de exposição

De qualquer maneira, a presença de células inflamatórias na polpa coronal próxima à lesão foi maior. Essa presença reduzia à medida que se aproximava da região apical sendo a extensão da reação inflamatória moderada e acompanhada de congestão vascular. A desorganização do tecido pulpar apresentou características moderadas, com poucos odontoblastos, vasos hiperêmicos, a severas, com presença de debris celulares e matriz fibrosa (Figura 6b). A ruptura vascular com extravasamento de eritrócitos e a ausência da camada de odontoblastos também estavam presentes. A região periapical não apresentou alterações (Figura 6c).

No grupo controle, aos 3 dias notou-se a prevalência de processo inflamatório crônico. A intensidade e a extensão das células inflamatórias seguiram características semelhantes ao grupo tratado aos 3 dias, com presença mais acentuada de células inflamatórias na polpa coronal (Figura 6d), e reduzindo gradativamente a medida que se aproxima da região apical, mas mesmo assim apresentou moderada desorganização da camada odontoblástica e apresentou um processo inflamatório crônico na região da polpa radicular (Figura 6e).

A região periapical apresentou moderado desarranjo celular e discreta presença de células inflamatórias (Figura 6f). Não foi encontrada necrose em nenhum dos dentes avaliados nesse grupo, mas houve completa desorganização da camada odontoblástica e intensa vasodilatação.

França (2006) avaliando histologicamente a resposta do tecido pulpar de ratos utilizando diferentes materiais de proteção pulpar, após pulpotomia parcial, relatou que a pasta à base de hidróxido de cálcio aos 15 dias causou reação inflamatória semelhante ao encontrado nesse grupo, do tipo moderada à intensa, aumento da atividade fagocitária, com presença de necrose superficial abaixo do

material. Com relação à degeneração odontoblástica, 12 espécimes estudados por ele somente 3 apresentaram organização, 6 casos estavam em processo de organização e o restante apresentou ausência de odontoblastos.

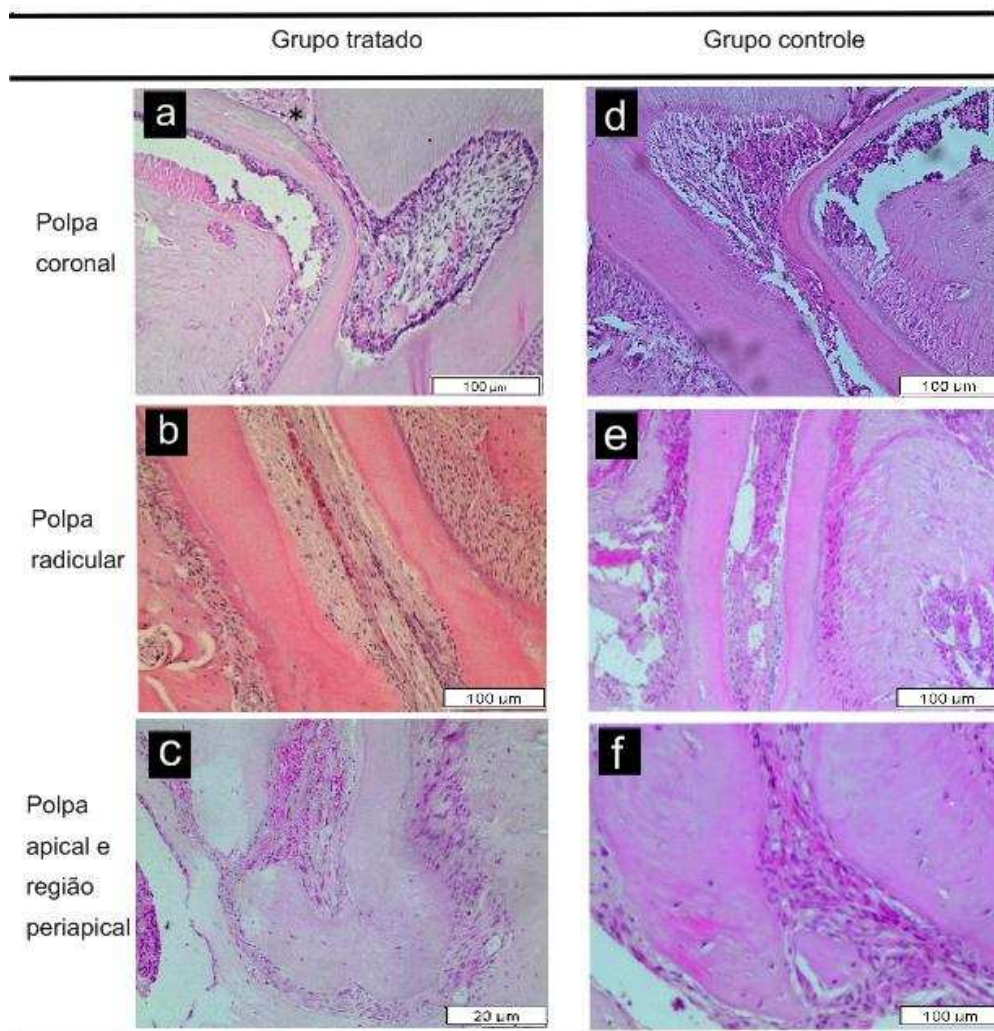


Figura 6. Fotomicrografia comparativa dos primeiros molares maxilares do grupo tratado e controle após 3 dias. Grupo tratado (a) Polpa coronal: alteração tecidual e vascular. Presença de fragmentos de tecido duro, debris celulares e fibrose; Polpa discretamente desorganizada, com pouca quantidade de células inflamatórias e integridade odontoblástica; (b) Polpa radicular: desorganização tecidual e vasos hiperêmicos, Congestão vascular, células desorganizadas; (c) Polpa apical: moderada reação inflamatória na região; (c) Região Periapical: sem alterações. Grupo controle (d) Polpa coronal: elevada desorganização celular e alteração da camada de odontoblastos; (e) Polpa radicular: Intenso processo inflamatório por extensão radicular; (f) Vasodilatação e hemorragia, poucas células inflamatórias e leve desorganização tecidual na região periapical. (aumento 100x) H&E

O grupo tratado, aos 8 dias a reação inflamatória foi predominantemente crônica com intensidade variável, mas a extensão obedeceu aos mesmos padrões do grupos de 3 dias, com maior incidência na polpa coronal (Figura 7a), mas apresentou redução gradativa em direção a polpa apical, e em apenas um dente a inflamação se estendeu até a região periapical.

Também se observou a presença de fragmentos de tecido duro, debris celulares e fibrose na polpa coronal, além de uma intensa resposta inflamatória próxima ao local da lesão moderada degeneração da camada odontoblástica.

A polpa radicular, com exceção de um único dente necrosado, a desorganização celular e da camada odontoblástica foi um pouco mais intensa, com presença de vasos congestos e/ou hiperêmicos (Figura 7b).

A região apical foi acometida de forma discreta quanto à desorganização e degeneração celular, assim como também foi discreta a presença de células inflamatórias (Figura 7c).

No grupo controle após 8 dias a reação inflamatória foi crônica de elevada intensidade e extensão. Dois dentes apresentaram processo inflamatório mais acentuado, da polpa coronal com presença de lesões vasculares e desorganização celular mais intensas (Figura 7d) que se prolongaram até a porção medial da polpa radicular.

Juntamente com a extensa ação da atividade inflamatória observou-se severa perda da camada odontoblástica e lesões vasculares até a região apical (Figura 7e) com moderada desorganização celular, hiperemia e alterações da camada odontoblástica na região periapical (Figura 7f). A necrose parcial esteve presente em metade das amostras.

Essa característica também foi relatada por Cordeiro *et al.* (1985) que descreveu que a ação do hidróxido de cálcio na polpa dentária em ratos induz a hiperemia vascular, congestão de hemácias, resíduos necróticos, fragmentos de dentina e concentrações neutrofílicas definidas como microabscessos e acentuada degeneração da camada odontoblástica.

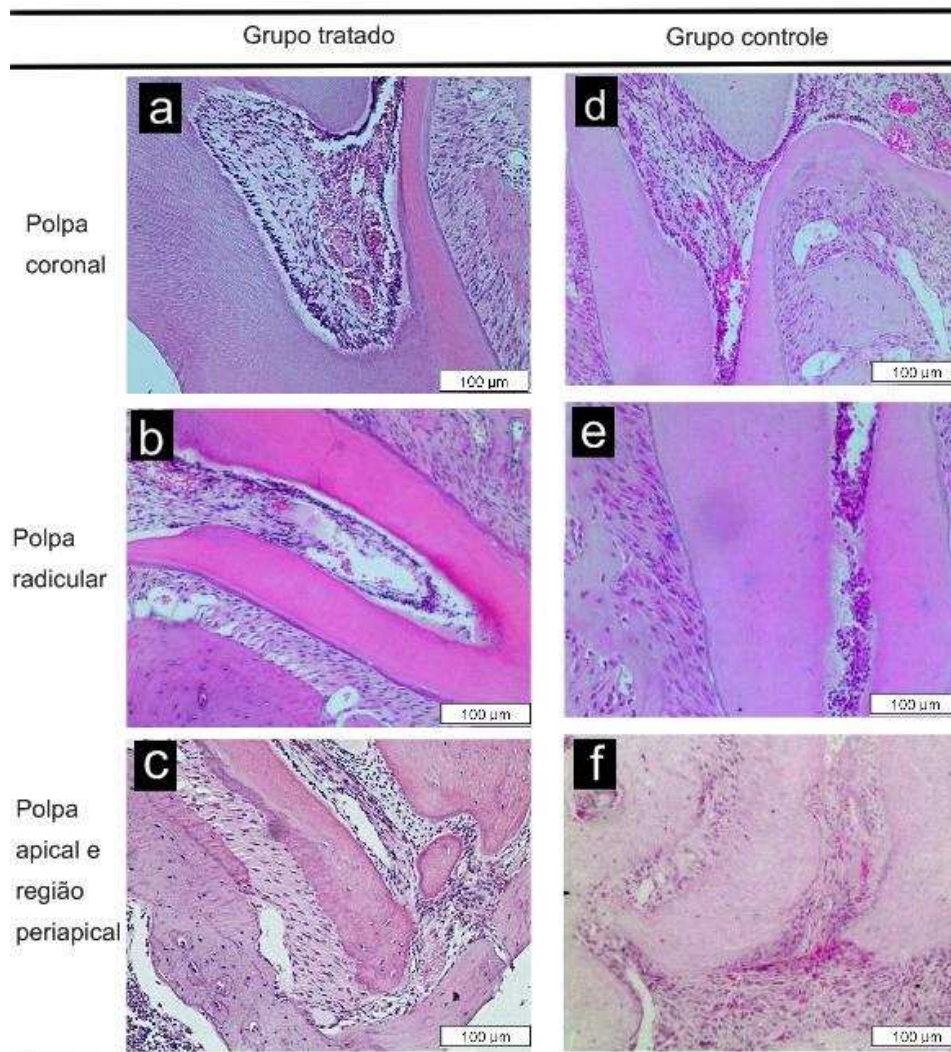


Figura 7: Fotomicrografia dos primeiros molares maxilares do grupo tratado e controle após 8 dias. Grupo tratado (a) Polpa coronal: intensa reação inflamatória, com debris celulares, hiperemia, lesão vascular e camada de odontoblastos com moderada alteração; (b) Polpa radicular: hiperemia acentuada e alteração moderada da camada odontoblástica; (c) Polpa apical e região periapical: moderada desorganização celular e poucas células inflamatórias; Grupo controle (d) Polpa coronal: hiperemia, moderada alteração da camada odontoblástica (e) Polpa radicular: processo inflamatório crônico, presença acentuada de células mononucleadas, ausência da camada odontoblástica e elevada lesão vascular. (f) Polpa apical e região radicular: intensa reação inflamatória e alteração da camada odontoblástica, desorganização tecidual e lesão vascular. (aumento 100x) H&E

Diferente do que foi demonstrada na avaliação citotóxica *in vitro*, a ação do OE, comparada à resposta na análise *in vivo* não foi a mesma. Essa condição pode estar relacionada à diferença entre as análises, pois enquanto no estudo *in vitro* exigiu um procedimento onde houvesse diluição do OE, com quebra da tensão

superficial, o que pode tê-la tornado uma solução citotóxica do que a apresentada com o OE puro.

A ação irritante do hidróxido de cálcio também foi alterada devido a maior viscosidade do OE já que de acordo com Mohammadi e Dummer (2011) essa característica proporciona uma menor dissociação iônica do hidróxido de cálcio. Nesse contexto, nota-se que aos 3 dias, os dentes tratados mostraram uma evolução mais lenta das etapas do processo inflamatório, definido como processo inflamatório misto.

Sarreta *et al.*, (2004) definiu como processo inflamatório não agudo e não crônico, onde o quadro inflamatório encontra-se na fase de transição, isto é, entre o fim processo inflamatório agudo e o início da resposta inflamatória crônica.

Já no grupo controle aos 3 dias o processo crônico estava evidente sendo o mesmo evidenciado após esse período, aos 8 dias, tanto o grupo tratado quanto o controle que apresentaram inflamação crônica, mas em maior intensidade e extensão.

Portanto para esse estudo podemos assumir que o OE permitiu que a evolução do processo inflamatório pulpar no grupo tratado, aos 3 dias, ocorresse de forma mais gradual do que no grupo controle.

Em relação à extensão e a intensidade do processo inflamatório o grupo que apresentou pior resposta foi no grupo controle aos 8 dias. Esse mesmo grupo ainda apresentou severa lesão vascular e acentuada perda da camada odontoblástica.

Já o restante dos grupos apresentou intensidade e extensão moderadas, mas em relação a hiperemia e a integridade da camada odontoblástica os dentes tratados, com 3 e 8 dias, apresentaram discreta melhora quando comparados ao grupo controle no mesmo período.

O OE também promoveu aumento de presença de fibras colágenas, nos grupos tratados. Esse evento foi citado por Valente (2006) em seu trabalho sobre a avaliação das propriedades tóxicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes do extrato de *S. aromaticum* e o caracterizou como uma antecipação dos eventos inflamatórios e cicatriciais.

Esse estudo possibilitou analisar o efeito do OE de *O. basilicum* aplicado diretamente sobre a polpa dentária com presença de vitalidade, e mostrou ser

capaz de modular os efeitos inflamatórios promovendo uma maior integridade vascular e da camada odontoblástica pulpar.

5. CONCLUSÃO

A evolução do processo inflamatório do tecido pulpar, observada nesse estudo, mostrou que no tratamento utilizando o OE de *Ocimum basilicum* a transição do processo agudo para o crônico ocorreu de forma mais gradual do que mostrou o tratamento com hidróxido de cálcio.

Capaz de modular os eventos inflamatórios promovendo uma maior integridade vascular pulpar e da camada odontoblástica.

A aplicação diretamente do OE sobre a polpa dentária mostrou baixa citotoxicidade e ainda reduziu o efeito irritante do hidróxido de cálcio.

Isso torna o OE de *O. basilicum* uma opção como adjuvante nos tratamentos da polpa dentária com vitalidade presente na medicina veterinária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4.ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804 p.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Etnobotânica del género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en las comunidades afrobrasileñas. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n.1, p. 107-118, 1998.

BADER, G.; PLOHMANN, B; HILLER. K; FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Die Pharmazie**, v. 51, n.6, p. 414-417, 1996.

BASER, K.H.C.B.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 991p.

BASTOS, V.P.D.; GOMES, A.S.; LIMA, F.J.; BRITO, T.S.; SOARES, P.M.; PINHO, J.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H.; MAGALHÃES, P.J. Inhaled 1,8-Cineole Reduces Inflammatory Parameters in Airways of Ovalbumin-Challenged Guinea Pigs, **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v.108, n.1, p. 34 -39, 2011.

CAVALCANTI, Y.W.; PÉREZ, A.L.A.L.; XAVIER, G.D.R.; ALMEIDA, L.F.D.; Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microorganismos do canal radicular. **Revista de Odontologia da Unesp**, v.40, n. 5, p. 208-214, 2011.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

COHENCA, N.; PARANJPE, A.; BERG, J. Vital Pulp Therapy. **Dental Clinics of North America**, v.51, n.1, p.59-73, 2013

COHEN, S.; BURNS, R.C. Caminhos da polpa. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 848p.

CORDEIRO, R.C.L.; VONO, R.M.G.; LIA, R.C.C.L. Capeamento Pulpar Com Materiais À Base De Hidróxido De Cálcio. Estudo histológico comparativo em molares de rato. **Revista de Odontologia da Unesp**, v.14, n. 112, p. 1-12, 1985.

DANIEL, A.N.; SIMONE, M.S.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMA, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p. 212-217, 2009.

DEUS, Q. D. Endodontia. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

DOMINGUES-FALQUEIRO, L.M.; GIOSO, M.A. Comparação entre sessão única e a utilização do "curativo de demora" no tratamento endodôntico em cães: aspectos histopatológicos e microbiológicos. **Pesquisa Brasileira Veterinária**, v.27,n.5, p.191-193, 2007.

ESMERALDO, M.R.A.; CARVALHO, M.G.F.; CARVALHO, R.A.; LIMA, R.F.; COSTA, E.M.M.B. Inflammatory effect of Green própolis on dental pulp in rats. **Brasilian Oral Reserch**, v.27, n.5, p. 417-422, 2013.

FRANÇA, C.R.C. **Avaliação histológica da resposta do tecido pulpar de ratos após pulpotomia parcial com os cimentos MTA ProRoot, MTA Angelus, Portland e pasta à base de hidróxido de cálcio**. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade de Riberão Preto, Riberão Preto, SP, 2006.

FREIRES, I.A.; CAVALCANTI, Y.W. Proteção do complexo dentinopulpar: indicações, técnicas e materiais para uma boa prática clínica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, n. 4, p. 69-80, 2011.

GERMER, S. P. M. **Extração do óleo essencial de cravo-da-índia em leite fixo com dióxido de carbono líquido subcrítico**. 1989 Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.92, 1989.

GORREL, C.. **Odontologia de pequenos animais. Soluciones Saunders en la práctica veterinária**. Espanã: Elsiever. 2010. 237.

HADNAGY, W.; MASETEZ, B.; IDEL, H. Hemolytic activity of crystalline silica - separated erythrocytes versus whole blood. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, n.2, p. 103-107, 2003.

HASHEMINIA, S.M.; FEIZI, G; RAZAVI, S.M., FEIZIANFARD, M.; GUTKNECHT, N.; MIR, M. A comparative study of three treatment methods of direct pulp capping in canine teeth of cats: a histologic evaluation. **Lasers in Medical Science**, v.25, n.1, p.9-15, 2010.

HO, Y.C.; HUANG, F.M.; CHANG, Y.C. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. **International Endodontic Journal**, v.39, n.3, p.389–393, 2006.

HUME, W.R. An analysis of the release and the diffusion through dentine of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. **Journal of Dental Research**, v.63, n.6 , p.881–884, 1984.

ISMAIL, M. Central Properties and Chemical Composition of Ocimum basilicum Essential Oil. **Pharmaceutical Biology**, v.44, n.8, p.619–626, 2006.

LAGE, T.C.A.; MONTANARI, R.M.; FERNANDES, S.A.; MONTEIRO, C.M.O.M.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R.S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v.148, p.24-29, 2015.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2.ed.Fortaleza: Imprensa Universitária – UFC, 2000. 344.

MORAMMADI, Z.; DUMMER, P.M. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **Internal Endodontic Journal**, v.8, n.44, p.697-730, 2011.

NANCI, A. Estrutura dos Tecidos Orais. Tem Cate, histologia oral. 8.ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 400p.

NIEMIEC, B.A. Fundamentals of Endodontics. **Veterinary Clinics of North America**, v.35, n.4, p.837–868, 2005.

NIEMIEC, B.A. Oral Pathology. **Topics Companion Animal Medicine**, v.23, n.2, p.59-71, 2008.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v16, n.1, p.77-82, 2006.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bul**, v.47, n.3, p.403-435, 1992.

PEANA, A.T.; MONTIS, M.G.D.; SECHI, S.; PIPPIA, P. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E₂. **European Journal of Pharmacology**, v.497, n.3, p.279-84, 2004.

PEREIRA, R.C.; MOREIRA, A.L. M. **Manjeriço: cultivo e utilização**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.31, 2011.

REGINATO, G.T.; JARDIM, J.J.; KLEIN, L.C.; FACHIN, E.V.F. Considerações clínicas atuais quanto ao uso da medicação intracanal pós-pulpectomia. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v.9, n. 2, p. 55-59, 2004.

ROSA, A.B.; MACEDO, D.W.V.F. **Proteção da polpa dental exposta**, 2003, 65 f. Tese (Especialização) – Curso de Especialização em Endodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.63, 2003.

ROSADO, L.D.S.; PINTO, J.E.B.P.; BOTREL, P.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.2, p.291-296, 2011.

RUNYORO, D.; NGASSAPA, O.; VAGIONAS, K.; ALIGIANNIS, N.; GRAIKOU, K.; CHINO, I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v.119, n.1, p.311-316, 2010.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v.14, p.240-244, 2000.

SAJJADI, S.E. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Daru*, v.14, n.3, p.128-30, 2006. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* . v.70, n.1, p.14-23, 2004.

SARRETA, S.M.C.; DORGAM, J.V.; SOUZA, B.B.; FERREIRA, M.D.S.; MELO, V.R.M.; ANSELMO-LIMA W. Histopatologia da lâmina própria do seio maxilar na rinossinusite crônica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.70, n.1, p.14-23, 2004.

SILVA, G.L.; LUFT, C.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R.H.; MELO, D.A.; DONADIO, M.V.; NUNES, F.B.; DE AZAMBUJA, M.S.; SANTANA, J.C.; MORAES, C.M.; MELLO, R.O.; CASSEL, E.; PEREIRA, M.A.; OLIVEIRA, J.R. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, supl.2, p.1397-1408, 2015.

SIMON, J.E.; JAMES Q.; RENEE G.M. **Basil: a source of essential oils**. Disponível em: <<https://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/V1-484.html>>. Acesso em 05 mar. 2015.

SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, N.I.; LOPES, H.P., ALVES, F.R.F.; OLIVEIRA, J.C.M.; ARMADA, L.; PROVENZANO, J.C. Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa viva. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.68, n.2, p. 161-165, 2011.

STANKIEWICZ, A.; COLOMBELLI, C.M.; GONÇALVES, T.S., FORTES, C.B.B.; MUNERATO, M.C.; SAMUEL, S.M.W. Avaliação das propriedades do cimento de óxido de zinco e isogenol. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v.42, n.2, p.14-20, 2000.

TROPE, M. Regenerative Potencial of Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, v.34, n.78, p.13-17, 2008.

VALENTE, R.O.H. **Avaliação das propriedades tóxicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes do extrato de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.)**. 127 f. Teses (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, João Pessoa, BA, 2006.