

Efetividade de dissolução da guta-percha e segurança do uso de óleos essenciais do gênero *Citrus*

Effectiveness of gutta-percha dissolution and safety of using Citrus essential oils

Carolina de Lélis Rodrigues Pereira^{1*}, Roberta Passos do Espírito Santo², Nádia Rezende Barbosa Raposo³, Carolina Paula de Souza Moreira⁴, Henrique Duque Netto⁵, Maria das Graças Afonso Miranda Chaves⁶

¹Cirurgiã-Dentista, Mestra em Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF); ²Cirurgiã-Dentista, Doutora em Saúde, UFJF, Professora da Faculdade de Odontologia, UFJF; ³Farmacêutica Bioquímica, Doutora em Toxicologia, Universidade de São Paulo (USP), Professora da Faculdade de Farmácia, UFJF; ⁴Farmacêutica, Doutora em Ciências da Saúde, FIOCRUZ, Pesquisadora, Fundação Ezequiel Dias (FUNED); ⁵Cirurgião-Dentista, Pós-Doutor em Cirurgia Maxilofacial, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Professor da Faculdade de Odontologia, UFJF; ⁶Cirurgiã-Dentista, Doutora em Biopatologia Bucal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Professora da Faculdade de Odontologia, UFJF

Resumo

Introdução: nos casos de insucesso endodôntico, o retratamento não cirúrgico é a terapia preferencial, que envolve a remoção do material obturador dos canais radiculares. Para o procedimento, é indicado o uso de solventes, embora eles geralmente apresentem toxicidade e não preencham os requisitos ideais. Este estudo buscou óleos essenciais com boa capacidade de dissolução da guta-percha e com atividade antimicrobiana contra patógenos associados a falhas endodônticas, além de maior biocompatibilidade.

Metodologia: avaliou-se a eficácia na dissolução da guta-percha de três óleos do gênero *Citrus*. Os resultados foram comparados aos solventes endodônticos convencionais (C1, eucaliptol; C2, endosolv® E; e C3, clorofórmio). A análise do perfil químico foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, e a efetividade dos óleos essenciais na remoção da guta-percha por testes de desintegração e dureza. A atividade antimicrobiana foi realizada pela análise turbidimétrica contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, e a atividade antioxidante, pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio. **Resultados:** *D-limoneno* foi o principal composto. Os óleos 1 e 3 foram eficazes na remoção da guta-percha no teste de dureza, superando o C1 e mostrando resultados semelhantes ao C2. No teste de desintegração, o óleo mais efetivo foi o 3, que foi superior ao C1 e igual ao C2. O óleo 3 destacou-se ainda na atividade antimicrobiana e antioxidante. **Conclusão:** conclui-se que o óleo 3 (*Citrus sinensis*) parece ser uma alternativa natural, viável e segura, quando comparado aos solventes convencionais, pois apresenta compostos com capacidade efetiva de dissolução de guta-percha, além de exibir atividades complementares como antimicrobiano e antioxidante.

Palavras-chave: Óleo essencial; fitoterapia; endodontia; guta-percha; odontologia.

Abstract

Introduction: In cases of endodontic failure, non-surgical retreatment is the preferred therapy, which involves the removal of the root canal filling material. Solvents are indicated for the procedure, although these often exhibit toxicity and do not meet the ideal requirements. This study sought essential oils with good gutta-percha dissolution capacity and antimicrobial activity against pathogens associated with endodontic failures, in addition to greater biocompatibility. **Methodology:** The effectiveness of three Citrus essential oils with good gutta-percha dissolution was evaluated. The results were compared to conventional endodontic solvents (C1, eucalyptol; C2, endosolv® E; and C3, chloroform). The chemical profile analysis was performed using gas chromatography coupled with mass spectrometry, and the effectiveness of the essential oils in removing gutta-percha was determined through disintegration and hardness tests. The antimicrobial activity was measured using turbidimetric analysis against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, and the scavenging reactive oxygen species determined the antioxidant activity. **Results:** D-limonene was the main compound. Oils 1 and 3 were effective in removing gutta-percha in the hardness test, surpassing C1 and showing results similar to C2. In the disintegration test, the most effective oil was 3, which was superior to C1 and equivalent to C2. Oil 3 also stood out in antimicrobial and antioxidant activity. **Conclusion:** it is concluded that oil 3 (*Citrus sinensis*) appears to be a natural, viable and safe alternative when compared to conventional solvents, as it presents compounds with effective gutta-percha dissolution capacity, in addition to exhibiting complementary activities such as antimicrobial and antioxidant.

Keywords: Essential oil; Phytotherapy; Endodontics; Gutta-percha; Dentistry.

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico consiste em um método químico-mecânico de desinfecção do sistema de canais radiculares (SCR), seguida da obturação hermética tri-

dimensional desses canais. O objetivo é eliminar e (ou) reduzir os microrganismos causadores de doenças da polpa e do periápice, bem como aumentar a cicatrização e a reparação do tecido perirradicular. É indicado para dentes que sofreram necrose pulpar ou apresentam inflamação irreversível da polpa. Os materiais mais utilizados para a obturação são os cones de guta-percha (GP) em associação ao cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE)¹.

Correspondente/ Corresponding: *Carolina de Lélis Rodrigues Pereira – Endereço: Rua Coronel Antônio Pedro, N° 97 / apt 601. Centro. Rio Pomba (MG), CEP: 36180000 – E-mail: carol.lelis.1@gmail.com

Alguns motivos podem levar a falha do tratamento endodôntico, como infecções persistentes, preparo químico mecânico insuficiente, obturação insatisfatória, infiltração coronária, canais remanescentes não tratados, entre outros². Destaca-se, na literatura, a persistência de infecções intra e extrarradiculares como a causa mais prevalente do insucesso dessa terapia³. Os microrganismos mais frequentemente associados são *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*^{2,4}.

Nos casos de insucesso endodôntico, sempre que possível, a terapia preferencial deve ser o retratamento endodôntico não cirúrgico, pois é menos invasivo, em comparação com as cirurgias perirradiculares, e apresenta maiores taxas de sucesso⁵. O procedimento consiste na remoção do material obturador, reinstrumentação e reobturação de canais radiculares, com o objetivo de superar as deficiências da terapia anterior⁶.

Para realizar a remoção da GP dos canais radiculares, existem diversas técnicas, tais como limagem manual, instrumentação rotativa, métodos térmicos e uso aparelhos ultrassônicos. Elas podem ser aplicadas de forma isolada ou associadas a substâncias solventes, sendo a utilização de métodos combinados a forma mais indicada, eficaz e segura^{6,7}.

O uso de solventes orgânicos no retratamento endodôntico tem sido um aliado para a completa remoção dos materiais obturadores, além de contribuir para a desinfecção do SCR⁸. Essa remoção pode representar um desafio, principalmente em áreas críticas de curvatura de raiz, onde existe risco de perfuração, sendo preconizado pela literatura o uso dessas substâncias para auxiliar no amolecimento da GP. Muitas opções estão disponíveis no mercado, e, dentre as mais utilizadas, estão o clorofórmio, o tetracloroetileno (endosolv® E) e o eucaliptol^{8,9}.

Mesmo com a variedade de ofertas, a literatura demonstra que nenhuma delas preenche os requisitos de um solvente ideal, o qual deve ser não tóxico, não carcinogênico, apresentar dissolução eficiente de GP, e apresentar tempo de ação viável clinicamente. Quando depositadas na porção apical da raiz, caso apresentem citotoxicidade, as substâncias podem levar a exacerbação da reação inflamatória dos tecidos periapicais, cursando com sintomatologia pós-operatória e prejuízo para a reparação tecidual apical¹⁰. Um exemplo é o clorofórmio, que possui potencial carcinogênico e elevada toxicidade para as células humanas¹¹. Já o tetracloroetileno apresen-

ta ação tóxica para o fígado e rins, e é classificado como potencialmente cancerígeno¹².

Em 2008, o Conselho Federal de Odontologia (CFO), através da resolução nº 82, reconheceu e regulamentou o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal, dentre elas, o uso da fitoterapia. Na odontologia, muito se tem buscado, especialmente nos óleos essenciais (OEs), encontrar substâncias com boa atividade dissolutiva da GP, satisfatória atividade antimicrobiana contra os patógenos associados aos casos de insucesso endodôntico, maior biocompatibilidade, menor toxicidade aos tecidos e baixo custo^{13,14}. A utilização de fitoterápicos como alternativa aos solventes convencionais pode apresentar aspectos interessantes, como estímulo à agricultura familiar, redução do impacto ambiental, e descoberta de compostos menos tóxicos à saúde humana e com melhor efetividade.

Duas substâncias naturais já são utilizadas como solventes: o eucaliptol e o óleo essencial de laranja. O primeiro apresenta ação lenta e capacidade emoliente inferior, em comparação com solventes convencionais, como o clorofórmio e tetracloroetileno¹⁵. Já o óleo de laranja (gênero *Citrus*) é um excelente solvente alternativo, por apresentar boa ação dissolutiva e ser biocompatível¹⁶. Os OEs advindos do gênero *Citrus* representam uma alternativa natural viável aos solventes convencionais, embora as pesquisas existentes na área odontológica não especifiquem de que planta o óleo foi extraído, que parte da planta foi utilizada e qual a composição química dessa matriz complexa que o óleo essencial representa¹⁷.

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade na dissolução da guta-percha, mensurar os potenciais biológicos e a segurança de três óleos essenciais pertencentes ao gênero *Citrus* (*Citrus paradisi*, *Citrus limon* e *Citrus sinensis*). Os resultados obtidos foram comparados aos dos solventes endodônticos conhecidos e utilizados na odontologia (clorofórmio, endosolv® E e eucaliptol).

METODOLOGIA

AMOSTRAS

Todas as amostras deste estudo experimental foram adquiridas comercialmente, conforme é mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Informações sobre as substâncias de interesse avaliadas neste estudo.

Código	Substância	Nome popular	Parte da planta	Fabricante
Óleo 1	<i>Citrus paradisi</i>	Grapefruit rosa	Cascas dos frutos	Grupo Laszlo
Óleo 2	<i>Citrus limon</i>	Limão siciliano	Cascas	Grupo Laszlo
Óleo 3	<i>Citrus sinensis</i>	Laranja sanguínea	Cascas	Grupo Laszlo
Controle 1 (C1)	Eucaliptol*	NA	NA	Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda.
Controle 2 (C2)	Endosolv® E	NA	NA	Septodont*
Controle 3 (C3)	Clorofórmio	NA	NA	Labsynth produtos para laboratório Ltda.

NA = não se aplica; *Importado e distribuído no Brasil por TDV Dental Ltda.

Fonte: elaborado pela autora (2024).

As amostras foram submetidas às análises laboratoriais. O perfil químico dos óleos essenciais foi avaliado por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), e a efetividade dos óleos essenciais na remoção da guta-percha, pelos testes de desintegração e dureza por penetração. Em relação aos potenciais biológicos, a atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da análise turbidimétrica contra *E. faecalis* e *C. albicans*, e a atividade antioxidante foi medida pelo método de sequestro de espécies reativas de oxigênio.

PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

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

Para o preparo das amostras, 20 µL do óleo essencial ou padrão n-alcanos (C7 a C30 – Sigma-Aldrich) foram adicionados a 980 µL de acetato de etila (grau HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) em vials apropriados para o injetor.

As condições analíticas incluíram: temperaturas do forno 60°C e do injetor 220°C, gradiente linear 60°C - 240°C, com variação de 3°C/minuto, fluxo do gás de arraste (hélio) de 8,5 mL/minuto, injeção de 1 µL e operação em modo *split* de 1:5; ionização eletrônica de 70 eV. O detector foi programado para registrar taxas de massas (varredura) entre 20 e 500 m/z. A temperatura da fonte foi de 290°C, da interface de 280°C, e o ganho do detector de 1,05 kV.

Os dados obtidos foram analisados comparando-se o perfil de fragmentação da molécula no espectro de massas, com os dados depositados na biblioteca NIST (do inglês *National Institute of Standards and Technology*) e a similaridade calculada pelo *software* GC-MS *Postrun Analysis*. Padrões de fragmentação também foram comparados aos padrões da literatura internacional¹⁸.

O índice de Kovatz (Equação 1) e o índice de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI, do inglês *Linear Temperature Programmed Retention Indexes*) (Equação 2) foram calculados e, posteriormente, comparados com a literatura¹⁸.

Equação 1 – Cálculo do Índice de Kovatz.

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

KI= Índice de Kovatz; t'R = tempo de retenção ajustado; i = analito; n = número de carbonos do padrão adjacente menos retido; n+1 = número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

Fonte: elaborado pela autora, 2024.

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 retido¹⁹.

Equação 2 – Cálculo do Índice de retenção com programação linear de temperatura.

$$LTPRI = 100n + 100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}}$$

LTPRI= Índice de retenção com programação linear de temperatura; t'R = tempo de retenção ajustado; i = analito; n = número de carbonos do padrão adjacente menos retido; n+1 = número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

Fonte: elaborado pela autora, 2024.

TESTE DE DESINTEGRAÇÃO

A quantidade total de amostra para esse teste compreendeu 81 cones de guta-percha (tamanho M, 28 mm, ENDOPOINTS®). Cada grupo de interesse a ser testado foi composto de 3 cones de guta-percha.

O ensaio foi realizado em triplicata e em conformidade com o descrito por Ramos, Câmara, Aguiar²⁰ (2016): os cones de GP foram pesados em uma balança analítica; em seguida, foram colocados em um tubo de vidro cilíndrico e permaneceram submersos em 2 mL das substâncias-teste por 5 minutos.

Posteriormente, os cones foram lavados com água destilada (100 mL), com auxílio de uma seringa de 20 mL, cujo conteúdo foi dispensado manualmente em jatos contínuos (5 vezes de 20 mL). Em seguida, os cones foram mantidos em temperatura ambiente por 72 horas para secagem em peneiras granulométricas de aço inoxidável. Após a secagem, os cones de guta-percha foram pesados novamente para avaliar a perda de massa. A massa perdida (Mp) foi calculada pela massa inicial (Mi) dos cones menos a massa final (Mf).

TESTE DE DUREZA

Para esse teste, foi utilizada metodologia adaptada de estudos semelhantes^{21,22}. Trinta e seis corpos de prova foram confeccionados e divididos em 9 grupos, cada qual com 4 espécimes. Um tubo cilíndrico foi dividido em três partes iguais de 10 mm. Na porção inferior, foi colocado o restaurador temporário Obtur (Maquira). Em seguida, foram acrescentados 10 mm de guta-percha bastão (Ohdacam, Dentsply sirona), plastificada através de uma seringa metálica em alta temperatura.

Os corpos de prova foram submetidos ao banho ultratermostático (SL 152, SOLAB) por 1 hora na temperatura de 37°C ± 0,2°C, simulando o ambiente oral. Posteriormente,

te, foi adicionado 0,1 mL da substância-teste na porção superior do corpo de prova, com tempo de atuação de 5 minutos e mantidos em banho ultratermostático nas mesmas condições.

Após esse intervalo de tempo, foi realizado o teste de força de compressão por meio da máquina de ensaio universal (EMIC DL 20KN, Instron). 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.

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

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste de atividade antimicrobiana seguiu padrões de qualidade em pesquisa microbiológica, sendo realizados procedimentos rígidos de esterilização e manutenção da cadeia asséptica.

As cepas empregadas foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), a saber: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). O protocolo analítico se deu através 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 auxílio do espectrofotômetro. Após a padronização, realizou-se a diluição seriada com soro fisiológico estéril.

Posteriormente, foi realizada a incubação da suspensão microbiana, em duplicata e em placas de Petri, nas diluições de 10^{-7} a 10^{-9} , por um 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 a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) para preparo da solução padronizada na concentração de 3×10^3 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 estéril, de fundo chato, foram adicionados 100 μ L do inóculo e 100 μ L das substâncias-teste (óleos e controles: eucaliptol, endosolv® E e clorofórmio) em diferentes concentrações (1,9 μ g/mL até 1000 μ g/mL).

Os fármacos de referência utilizados foram: o antibiótico cloranfenicol (250 μ g/mL a 1,95 μ g/mL, para *E. faecalis*) e o antifúngico nistatina (64 UI a 0,125 UI, para *C. albicans*).

Como controles negativos, 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 à temperatura de 37°C por 24 horas para *E. faecalis* e 48 horas para *C. albicans*, em ambiente aeróbico.

A CIM é considerada a menor concentração que não apresenta crescimento microbiano detectado pela turvação do meio. Com objetivo de diferenciar a atividade antimicrobiana em bactericida ou bacteriostática e entre fungicida ou fungistática, foram pipetados 20 μ L 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 μ L de cada poço para 1 mL de meio *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) para *C. albicans*. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata²³.

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.

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, Rao²⁴ (1996), com algumas modificações. Iniciou-se com o preparo da solução de DPPH na concentração de 0,05 mM. Para um balão volumétrico, foram transferidos 1 mg de DPPH e 50 mL de etanol absoluto; em seguida, o balão foi levado ao ultrassom por 2 minutos.

As amostras dos óleos testados foram preparadas a partir de 10 μ L de óleo e 10 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), solubilizados em 1980 μ L de etanol para análise (PA), obtendo-se uma solução inicial de 5000 μ g/mL. Dessa, foram aliqüotados 200 μ L, aos quais foram adicionados 800 μ L de etanol PA, obtendo-se uma solução com concentração de 1000 μ g/mL. Foram realizadas diluições seriadas com utilização do etanol PA como diluente. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 50 μ L da amostra, em diferentes concentrações, e 150 μ L de DPPH. Ao término do processo, foram obtidas concentrações-teste na faixa de 0,122 a 250 μ g/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 intervalo, foi realizada a leitura de absorvância na placa, com emprego do espectrofotômetro (Multiskan GO, Datamed) 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 μ L de etanol absoluto que foi adicionado a 50 μ L da solução-teste. O padrão de referência utilizado no ensaio foi o ácido ascórbico. O ensaio foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada por meio da Equação 3.

Equação 3 – Cálculo da atividade antioxidante.

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

A amostra = valor da absorbância para a solução que contém a amostra mais o DPPH; *A controle* = valor de absorbância da amostra mais o etanol PA; *ADPPH* = absorbância da solução de DPPH.

Fonte: elaborado pela autora, 2024.

RESULTADOS**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 com o que está 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.

Tabela 1 – Composição dos OEs obtidos por CG-EM e normas ISO correspondentes.

Amostra	Componentes	ISO (% mín. A máx.)			Valores do ensaio (%)
ÓLEO 1 <i>Citrus paradisi</i> (Grapefruit rosa)	α-pineno	0,2 a 0,6			2,17
	β-pineno	0,05 a 0,2			3,94
	Mirceno	1,5 a 2,5			4,16
	D-limoneno	92 a 96			70,04
	g-terpineno	-			5,05
	α-terpineno	-			2,10
ÓLEO 2 <i>Citrus limon</i> (Limão siciliano)	α-pineno	Espanha	Itália	Brasil	3,75
		1,5 a 3	1,5 a 3	1,4 a 3	
	β-felandreno	-	-	-	4,34
	β-pineno	10 a 16,5	10 a 16,5	7 a 16	13,65
	Mirceno	-	-	-	2,85
	D-limoneno	60 a 70	60 a 68	59 a 75	53,83
	g-terpineno	8 a 12	8 a 12	6 a 12	9,72
	α-bergamoteno	-	-	-	1,46
ÓLEO 3 <i>Citrus sinensis</i> (Laranja sanguínea)	β-bisaboleno	0,45 a 0,9	0,45 a 0,9	0,2 a 0,9	2,06
	α-pineno	0,4 a 0,8			1,14
	Sabineno	0,2 a 1			1,16
	Mirceno	1,5 a 3,5			2,97
	D-limoneno	93 a 96			71,07
	Linalol	0,15 a 0,7			1,73

CG-EM= Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

ISO= International Organization of Standardization.

Fonte: dados da pesquisa.

TESTE DE DESINTEGRAÇÃO

Foi realizada a análise exploratória (avaliação da distribuição) do conjunto dos dados encontrados para investigar os pressupostos estatísticos, visando o adequado uso das técnicas de análise, e, após análises de normalidade e homogeneidade, optou-se pelo teste ANOVA, que visa verificar se existem diferenças entre as médias da perda de massa em relação à substância utilizada. A partir do teste supracitado, é possível afirmar que existem diferenças estatísticas entre as substâncias analisadas, visto que se verificou sig = 0,000 (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste estatístico ANOVA para verificação de diferença entre as médias da perda de massa.

	Soma dos quadrados	Df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	0,039	8	0,005	141,645	0,000
Nos grupos	0,001	18	0,000		
Total	0,040	26			

Df= Graus de liberdade; F= estatística de Fischer. Sig. = significância.

Fonte: dados da pesquisa.

A Tabela 3 apresenta o relatório com dados da média de perda de massa e desvio padrão de cada substância-teste.

Tabela 3 – Média e desvio padrão em relação à perda de massa de cada grupo.

GRUPOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	n
1	-,041500	,0080876	-,0504	-,0346	3
2	-,025833	,0036088	-,0300	-,0237	3
3	-,063833	,0121253	-,0742	-,0505	3
C1	-,020733	,0072666	-,0288	-,0147	3
C2	-,073133	,0050895	-,0790	-,0699	3
C3	-,119267	,0029569	-,1225	-,1167	3
TOTAL	-,038470	,0392591	-,1225	-,0001	27

1= *Citrus paradisi*; 2= *Citrus limon*; 3= *Citrus sinensis*; C1= *Eucaliptol*; C2= *endosolv*® E; C3= *Clorofórmio*; n= número de amostras.

Fonte: dados da pesquisa.

Após a análise ANOVA, optou-se por verificar a existência de diferença estatística entre os grupos, utilizando-se o teste *post-hoc* Tukey-HSD, com intervalo de confiança de 95% (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação estatística dos dados de desintegração pelo teste *post-hoc* Tukey-HSD.

Subst.-teste	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
C1	3	0,020733			
2	3	0,025833	0,025833		
1	3		0,041500		
C2	3			0,063833	
3	3			0,073133	
C3	3				0,119267
Sig.	1,0000	0,973	0,081	0,604	1,000

1= *Citrus paradisi*; 2= *Citrus limon*; 3= *Citrus sinensis*; C1= *Eucaliptol*; C2= *endosolv*® E; C3= *Clorofórmio*; n= número de amostras; Sig. = Significância.

Fonte: dados da pesquisa.

TESTE DE DUREZA

É possível observar, na Tabela 5, os dados da força média (N) necessária para mover o espaçador endodôntico e o desvio padrão de cada substância-teste.

Tabela 5 – Força média necessária para mover o espaçador endodôntico.

Substância-teste	Força (Newton) (média ± desvio padrão, n=3)
Eucaliptol (C1)	7,24 ± 1,12
Endosolv® E (C2)	4,14 ± 0,10
Clorofórmio (C3)	3,79 ± 0,59
<i>Citrus paradisi</i> (O1)	6,03 ± 0,35
<i>Citrus limon</i> (O2)	6,21 ± 0,28
<i>Citrus sinensis</i> (O3)	6,04 ± 0,41

Fonte: dados da pesquisa.

Devido à constatação de normalidade e homogeneidade dos dados, optou-se pelo teste estatístico ANOVA (Tabela 6).

Tabela 6 – Teste estatístico ANOVA para verificação de diferença entre as médias das forças (N).

	Soma dos quadrados	Df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	59,355	8	7,419	16,128	0,000
Nos grupos	8,281	18	0,460		
Total	67,636	26			

Df = graus de liberdade; F = estatística de Fischer; Sig. = significância.

Fonte: dados da pesquisa.

Após a análise ANOVA, optou-se por verificar a existência de diferença estatística entre os grupos utilizando o teste *post-hoc* Tukey-HSD, com intervalo de confiança de 95% (Tabela 7). Constatou-se que o grupo 1 apresentou os melhores resultados, ou seja, utilizou as menores forças para deslocar o espaçador por 10 mm.

Tabela 7 – Avaliação estatística dos dados de dureza pelo teste *post-hoc* Tukey-HSD.

	Substância-teste	n	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^a	C3	3	3,4467			
	C2	3	4,0200	4,0200		
	3	3		5,6467	5,6467	
	1	3		5,7433	5,7433	5,7433
	2	3			6,0133	6,0133
	C1	3			6,0900	6,0900
	Sig.		0,977	0,105	0,134	0,052

1 = *Citrus paradisi*; 2 = *Citrus limon*; 3 = *Citrus sinensis*; C1 = *eucaliptol*; C2 = *endosolv*® E; C3 = *clorofórmio*; n = número de amostras.

Fonte: dados da pesquisa.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizados CIM e CFM para a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Apenas os óleos essenciais 1 e 3 apresentaram eficácia contra o fungo testado. Nenhum dos controles avaliados apresentou eficácia contra essa cepa nas condições experimentais, conforme é observado na Tabela 8.

Tabela 8 – Atividade antifúngica das substâncias de interesse frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

Substância-teste	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
Óleos 1 e 3	250	500
Óleo 2	>1000	>1000
C1 – Eucaliptol	>1000	>1000
C2 – Endosolv® E	>1000	>1000
C3-Clorofórmio	>1000	>1000
Nistatina	8 UI	32 UI

Óleo 1= *Citrus paradisi*; Óleo 2= *Citrus limon*; Óleo 3= *Citrus sinensis*; CIM= concentração inibitória mínima; CFM= concentração fungicida mínima; UI= unidades internacionais; µg/mL= micrograma por mililitro.

Fonte: dados da pesquisa.

Em relação à bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, nenhum óleo essencial ou controle apresentou efeito bactericida. Porém as substâncias testadas apresentaram efeito bacteriostático, ou seja, ocorreu inibição do crescimento bacteriano, quando comparadas às do grupo controle da metodologia (inóculos sem adição da substância-teste). As taxas de inibição de crescimento podem ser avaliadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Inibição mínima e máxima do *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 para as substâncias de interesse.

Substância-teste	Inibição mínima/máxima (%)	Concentração referente à inibição (µg/mL)
Óleo 1	13,07	62,5
	27,98	250
Óleo 2	14,26	15,62
	67,05	1000
Óleo 3	27,03	15,62
	69,19	500
C1- eucaliptol	38,17	3,9
	62,89	7,81
C2- endosolv® E	42,59	500
	61,24	3,9
C3- clorofórmio	48,16	125
	61,74	1000

Óleo 1= *Citrus paradisi*; Óleo 2= *Citrus limon*; Óleo 3= *Citrus sinensis*;
%= porcentagem; µg/mL= micrograma por mililitro.

Fonte: dados da pesquisa.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os OEs apresentaram atividade antioxidante não considerada dose-dependente, ou seja, não houve uma relação linear entre a atividade biológica e a concentração testada. Devido ao exposto, não foi possível realizar o cálculo da concentração inibitória 50% (CI_{50}), ou seja, a concentração necessária para consumir metade (50%) dos radicais livres presentes no DPPH. Os resultados estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade antioxidante das substâncias-teste pelo método de DPPH.

Substância-teste	Atividade antioxidante (% mínima e máxima)
Óleo 1	17 e 22
Óleo 2	18 e 22
Óleo 3	21 e 33
Eucaliptol (C1)	13 e 18
Endosolv® E (C2)	14 e 19
Ácido ascórbico (fármaco de referência)	11 e 64*

Óleo 1= *Citrus paradisi*; Óleo 2= *Citrus limon*; Óleo 3= *Citrus sinensis*.
*O ácido ascórbico apresentou relação de dose dependência (CI_{50} = concentração inibitória 50%).

Fonte: dados da pesquisa.

DISCUSSÃO

Devido à sua grande importância econômica, inúmeros estudos têm investigado a composição química dos óleos essenciais de cascas, folhas e flores de diferentes espécies de *Citrus*. Vale ressaltar que existe uma grande variação na composição química dos óleos cítricos, devido às diferenças de origem, cultivo, genética, idade e estágio de maturação da planta, estação do ano, clima (índice pluviométrico), método de extração, entre outras variáveis²⁵. Essa variabilidade pode ser notada também nas amostras analisadas neste estudo.

Óleos essenciais obtidos a partir de cascas de *Citrus* geralmente apresentam o D-limoneno, um hidrocarboneto monoterpeneo, como o composto mais abundante, com concentrações entre 60 a 95% do óleo²⁶. Esse composto foi majoritário em todos os óleos *Citrus* avaliados neste estudo.

Em relação ao teste de desintegração, o OE de laranja (óleo 3 – laranja sanguínea) apresentou ação superior ao eucaliptol no tempo de 5 minutos. Já no estudo utilizado como modelo de metodologia de perda de massa para o presente estudo²⁰, o OE de laranja e o eucaliptol não apresentaram diferenças estatísticas entre si em nenhum tempo de exposição à substância. Ademais, é cabível destacar que os autores não especificaram a espécie vegetal da qual foi extraído o óleo essencial de laranja.

De todos os OEs testados, *Citrus sinensis* (O3) apresentou maior média de perda de massa e se mostrou superior ao eucaliptol e estatisticamente semelhante ao endosolv® E. Ao analisar o perfil químico, observamos que *C. sinensis* é o OE do estudo que apresenta maior percentual de D-limoneno.

Diante do exposto, podemos sugerir que um maior percentual de D-limoneno pode resultar em uma maior dissolução de GP, visto que o D-limoneno (refinado do óleo de laranja) é utilizado como um solvente endodôntico alternativo, chamado GP-solvent (Nippon Shika Yakuhin, Shimonoseki, Japan), cuja composição é de 97% de D-limoneno e apresenta eficiência no amolecimento do material obturador^{10,27}. Porém foi demonstrado que o solvente pode ser tóxico para algumas linhagens celulares²⁸. Sendo assim, produtos naturais com D-limoneno, especialmente óleos cítricos, vêm sendo investigados por sua segurança e eficácia na remoção de guta-percha^{13,21}.

Os resultados obtidos no teste de dureza corroboram o encontrado no teste de desintegração, visto que dentre os OEs testados, o O1 (*Citrus paradisi*) e o O3 (*Citrus sinensis*) também apresentaram os melhores resultados, que são estatisticamente semelhantes ao C2 (endosolv® E) e superiores ao C1 (eucaliptol) nesse teste.

Jantarat, Malhotra, Sutimuntanakul²¹ (2013) empregaram metodologia similar à do presente estudo, ao avaliar a dureza por penetração de quatro OEs do gênero *Citrus*, adquiridos comercialmente (óleos de grapefruit, tangerina, lima e limão), comparando-os ao controle clorofórmio. Vale destacar que os autores

não informaram os tipos de óleo (nome completo da substância), de que parte da planta foram extraídos, e também não houve análise da composição dos óleos (perfil fitoquímico). Como resultado, eles demonstraram que o solvente mais eficaz foi o clorofórmio, seguido pelos óleos de grapefruit e tangerina, enquanto que os OEs menos efetivos foram os de lima e limão. Esse fato é compatível com os resultados obtidos no presente estudo, visto que o clorofórmio também demonstrou a melhor efetividade, e o óleo de grapefruit (O1) e o óleo de laranja (O3) foram os OEs mais efetivos nesta análise.

Espírito Santo¹³ (2022) realizou estudo semelhante ao nosso, no que diz respeito à metodologia, com utilização dos mesmos controles. Os resultados obtidos pela autora, no teste de dureza, são divergentes dos obtidos no presente estudo, visto que o OE de laranja (*Citrus aurantium dulcis*) se mostrou estatisticamente semelhante ao C3 (clorofórmio) e ao C2 (endosolv® E), e superior ao C1 (eucalipto). No presente estudo, o OE de laranja (*Citrus sinensis*) não foi tão efetivo quanto o C3, porém concorda, sendo estatisticamente semelhante ao C2 e superior ao C1. Mesmo em se tratando de óleos de laranja, eles são de tipos distintos, e, consequentemente, apresentam ações distintas, bem como perfil fitoquímico distinto (demonstrado por CG-EM), o que justifica a diferença nos resultados encontrados. Esse fato reforça a necessidade de informações completas (gênero, variação, parte da planta, local de cultivo, perfil fitoquímico, etc.) acerca dos óleos essenciais analisados.

Os óleos 1 (*Citrus paradisi*) e 3 (*Citrus sinensis*) demonstraram ação fungicida frente à *Candida albicans* ATCC 10231 (CFM = 500 µg/mL), sendo, portanto, os óleos com melhor atividade antimicrobiana.

Os óleos 1 e 3 apresentaram ação fungicida frente à *C. albicans* (CFM = 500 µg/mL), e foi demonstrado, no presente estudo, através de CG/EM, que eles foram os óleos cítricos com os maiores percentuais de D-limoneno (70,04% e 71,07%, respectivamente). Já o óleo 2 apresentou menor percentual de D-limoneno (53,83%), e não demonstrou ação fungicida frente à *C. albicans* (CFM > 1000 µg/mL). Diversos estudos demonstraram a atividade fungicida do D-limoneno frente à *C. albicans*^{29,30}. Muñoz et al.²⁹ (2020) comprovaram que o D-limoneno é capaz de gerar danos na parede celular das leveduras de *C. albicans*, podendo causar a ruptura dessa estrutura. O estudo de Thakre et al.³⁰ (2018) sugere que o D-limoneno atua inibindo o crescimento de *C. albicans* por estresse oxidativo induzido por danos na parede celular, consequentemente gerando danos no DNA e apoptose.

Em relação à bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, nenhum óleo essencial ou controle apresentou efeito bactericida. Porém as substâncias testadas apresentaram efeito bacteriostático, ou seja, ocorreu inibição do crescimento bacteriano, em comparação ao grupo de controle da metodologia (inóculos sem adição da substância-teste).

O óleo 3 (*Citrus sinensis*) apresentou a maior taxa de inibição de crescimento do microrganismo *E. faecalis*, atingindo 69,19%. Observa-se que os óleos 2 e 3 apresentaram uma maior inibição do crescimento bacteriano que os controles.

Ramesh, Keerthana³¹ (2021) demonstraram a efetividade do óleo extraído da casca de *Citrus sinensis* frente ao *E. faecalis* (CIM = 37,5 µg/mL e CBM = 59,42 µg/mL), corroborando a atividade satisfatória do OE no presente estudo. Os autores sugerem que sejam realizados testes de citotoxicidade para que o OE possa ser utilizado *in vivo*.

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir sua oxidação, de maneira eficaz³². A presença de satisfatória atividade antioxidante nos solventes pode se mostrar interessante para o retratamento endodôntico, visto que, na maioria dos casos de insucesso, observa-se presença de infecção e (ou) inflamação dos tecidos perirradiculares^{6,33}. Todos os OEs apresentaram maior atividade antioxidante (mínima e máxima) do que os controles (C1 e C2). Dentre todas as substâncias, o óleo 3 (*Citrus sinensis*) apresentou a maior atividade antioxidante absoluta (mínima e máxima).

A atividade antioxidante do óleo essencial 3, extraído da casca de *Citrus sinensis*, variou de 21% a 33%, o que é compatível com o estudo de Farahmandfar et al.³⁴ (2020), que encontrou atividade antioxidante de 30% ao utilizar óleo essencial obtido da casca de *C. sinensis* na concentração de 5 mg/mL. Apesar de não ser possível o cálculo da CI_{50} no presente estudo (não houve relação dose dependência), na pesquisa dos autores supracitados a CI_{50} foi encontrada na concentração de 7,8 mg/mL. Já o estudo de Chalova, Crandall, Rickie³⁵ (2010) apresenta resultados discordantes dos obtidos nesta pesquisa, visto que os autores demonstraram a atividade antioxidante máxima de 18% utilizando óleo essencial de *C. sinensis* pelo método de DPPH, embora não fosse especificada a parte da planta de onde o óleo foi extraído, e os autores não realizassem análise do perfil fitoquímico do referido óleo, não sendo possível identificar os compostos nele presentes.

CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados demonstrou que o óleo 3 (*Citrus sinensis*) parece ser uma alternativa natural, viável e segura, quando comparado aos solventes endodônticos convencionais, pois, em relação a todos os óleos essenciais testados, exibiu os melhores resultados de desintegração, dureza, e ainda exibiu atividades complementares desejáveis como antioxidante, bacteriostática contra *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, e fungicida frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

REFERÊNCIAS

- Bassam S, El-Ahmar R, Salloum S, Ayoub S. Endodontic postoperative flare-up: An update. *Saudi Dent J.* 2021;33(7):386–94. doi:10.1016/j.sdentj.2021.05.005
- Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Colado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(3):364–72. doi: 10.4317/medoral.22907
- Lee C, Song M. Failure of Regenerative Endodontic Procedures: Case Analysis and Subsequent Treatment Options. *J Endod.* 2022;48(9):1137–45. doi: 10.1016/j.joen.2022.06.002
- Siqueira Junior JF, Rôças IN. Present status and future directions - microbiology of endodontic infections. *Int Endod J.* 2022;55(Suppl 3):512-30. doi: 10.1111/iej.13677
- Signor B, Blomberg LC, Kopper PMP, Augustin PAN, Rauber MV, Rodrigues GS, et al. Root canal retreatment: a retrospective investigation using regression and data mining methods for the prediction of technical quality and periapical healing. *J Appl Oral Sci.* 2021;19(29):1-14. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0799
- Lopes HP, Siqueira Junior JF. *Endodontia: Biologia e técnica.* 4. ed. São Paulo: Elsevier; 2015. 848 p.
- Agrawal P, Sivarajan S, Ramanna PK, Jayan A, Sangeetha KM. Evaluation of Efficacy of Different Instrumentation for Removal of Gutta-percha and Sealers in Endodontic Retreatment: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(11):1269-73. doi: 10.5005/jp-journals-10024-2670
- Ferreira I, Braga AC, Vaz I. Effect of gutta-percha solvents on the bond strength of sealers to intraradicular dentin: a systematic review. *Iran Endod J.* 2021;16(1):17-25. doi: 10.22037/iej.v16i1.29297
- Dotto L, Sarkis-Onofre R, Bacchi A, Pereira GKR. The use of solvents for gutta-percha dissolution/removal during endodontic retreatments: a scoping review. *J Biomed Mater Res.* 2020;109(6):890-901. doi: 10.1002/jbm.b.34753
- Villas Boas MH. Análise das propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas de solventes endodônticos [tese de doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade Federal de São Paulo; 2015. 129 p.
- Alzraikat H, Taha NA, Hassouneh L. Dissolution of a mineral trioxide aggregate sealer in endodontic solvents compared to conventional sealers. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1-8. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0016
- Lash LH. Environmental and genetic factors influencing kidney toxicity. *Semin Nephrol.* 2019;39(2):132-40. doi: 10.1016/j.semnephrol.2018.12.003
- Espírito Santo RP. Óleos essenciais do gênero Citrus como alternativa aos solventes endodônticos convencionais: importância no cenário pandêmico da COVID-19 [tese de doutorado]. Juiz de Fora: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora; 2022. 94 p.
- Marinković J, Čulafić DM, Nikolić B, Đukanović S, Marković T, Tasić G, et al. Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. *Arch Oral Biol.* 2022;117:104842. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104842
- Aminsobhani M, Razmi H, Hamidzadeh F, Avval AR. Evaluation of the antibacterial effect of xylene, chloroform, eucalyptol, and orange oil on *Enterococcus faecalis* in nonsurgical root canal retreatment: an ex vivo study. *Biomed Res Int.* 2022;2022:1-9. doi: 10.1155/2022/8176172
- Barreto MS, Rosa RA da, Santini MF, Cavenago BC, Duarte MAH, Bier CAS, et al. Efficacy of ultrasonic activation of NaOCl and orange oil in removing filling material from mesial canals of mandibular molars with and without isthmus. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(1):37-44. doi: 10.1590/1678-775720150090
- Bayram E, Bayram HM, Aslan T, Göktürk H, Ustün Y. Evaluation of calcium silicate cement bond strength after using gutta-percha solvents. *Niger J Clin Pract.* 2017;20(11):1417-21. doi: 10.4103/1119-3077.197020
- Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4. ed. Estados Unidos: Allured Publishing Corporation; 2007. 804 p.
- Von Mühlen C. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica.* 2009;1(3):21-29.
- Ramos TIF, Câmara AC, Aguiar CM. Evaluation of capacity of essential oils in dissolving ProTaper Universal gutta-percha points. *Acta Stomatol Croat.* 2016;50(1):128-33. doi: 10.1564/asc50/2/5
- 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. *J Investig Clin Dent.* 2013;4:60-3. doi: 10.1111/j.2041-1626.2012.00143.x
- Oyama KON, Siqueira EL, Santos M. In vitro study of effect of solvent on root canal retreatment. *Braz Dent J.* 2002;13(3):208-11. doi: 10.1590/s0103-64402002000300014
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. *J Ethnopharmacol.* 2003;87(2-3):215-20. doi: 10.1016/s0378-8741(03)00149-1
- Sreejayan N, Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Drug Res.* 1996;46(2):169-71.
- Dosoky N, Setzer W. Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1966-99. doi: 10.3390/ijms19071966
- Jing L, Lei Z, Li L, Xie R, Xi W, Guan Y, et al. Antifungal activity of citrus essential oils. *J Agric Food Chem.* 2014;62(14):3011-33. doi: 10.1021/jf5006148
- Morais CAH de, Endo MS, Capitão M, Duarte MAH, Quieroz AF. Avaliação de substâncias químicas utilizadas como solventes no retratamento endodôntico. *Dent Press Endod.* 2017;7(3):62-5. doi: 10.14436/2358-2545.7.3.062-065.oar
- Vajrabhaya L.-O, Suwannawong SK, Kamolroongwarakul R, Pe-wklieng L. Cytotoxicity evaluation of gutta-percha solvents: chloroform and GP-solvent (limonene). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(6):756-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.05.002
- Muñoz JE, Rossi DCP, Jabes DL, Barbosa DA, Cunha FFM, Nunes LR, et al. In vitro and in vivo inhibitory activity of limonene against different isolates of *Candida* spp. *J Fungi.* 2020;6(3):183. doi: 10.3390/jof6030183
- Thakre A, Zore G, Kodgire S, Kazi R, Mulange S, Patil R, et al. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Med Mycol.* 2018;56(5):565-78. doi: 10.1093/mmy/myx074
- Keerthana T, Ramesh S. Antibacterial efficacy of Citrus sinensis (sweet orange) against *Enterococcus faecalis* - an in vitro study. *Ann Med Health Sci Res.* 2021;11(2):127-31.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902

33. Patel S, Barnes JJ. Contemporary endodontics – part 2. Br Dent J. 2011;211(11):517-24. doi: 10.1038/sj.bdj.2011.1002
34. Farahmandfar R, Tirgarian B, Dehghan B, Nemati A. 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. 2020;8(1):124-38. doi: 10.1002/fsn3.1279
35. Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents: solvent effect on antimicrobial and antioxidant activities of CPT Valencia orange oil. J Sci Food Agric. 2010;90(5):870-6. doi: 10.1002/jsfa.3897
-

Submetido em 31/10/2024
Aceito em 21/02/2025