



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

CAMILLA MUNIZ DE MELO

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA *ALOE VERA*
ASSOCIADA AO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EM
ENTEROCOCCUS faECALIS

ARACAJU - SE

Setembro/2016

CAMILLA MUNIZ DE MELO

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA *ALOE VERA*
ASSOCIADA AO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EM
*ENTEROCOCCUS faECALIS***

Artigo apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à conclusão do curso de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe para obtenção do grau de Cirurgiã-dentista.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior

ARACAJU - SE

Setembro/2016

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA *ALOE VERA* ASSOCIADA
AO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EM *ENTEROCOCCUS faECALIS***

AUTOR: _____

(Camilla Muniz de Melo)

ORIENTADORA: _____

(Prof^a. Dr^a. Maria Amália Gonzaga Ribeiro)

EXAMINADOR: _____

(Prof. Dr. José Mirabeau Ramos de Oliveira)

EXAMINADOR: _____

(Msc. Marta Judite Nunes Lima)

ARACAJU – SE

Setembro/2016

I – ARTIGO CIENTÍFICO

TÍTULO:

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA ALOE VERA ASSOCIADA AO
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO EM *ENTEROCOCCUS faECALIS*

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ALOE VERA ASSOCIATED WITH
CALCIUM HYDROXIDE IN *ENTEROCOCCUS faECALIS*

AUTORES:

Camilla Muniz DE MELO.¹

1– Acadêmica de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe - UFS, Aracaju,
Brasil.

camu.melo@hotmail.com

Andemilson Santos SILVA.²

2 – Acadêmico de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Sergipe – UFS,
Aracaju, Brasil.

andemilsonbio@gmail.com

Nathalia Luisa Carlos FERREIRA.³

3 – Acadêmica de Medicina da Universidade Federal de Sergipe – UFS, Aracaju, Brasil.

nathalia_lcf@hotmail.com

Nayane Chagas CARVALHO.⁴

4 – Mestranda em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe - UFS, Aracaju, Brasil.

nayanec@gmail.com

Antônio Márcio Barbosa JÚNIOR.⁵

5 – Professor Efetivo Assistente do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS, Aracaju, Brasil.

microbiologia.ufs@gmail.com

Maria Amália Gonzaga RIBEIRO.⁶

6 – Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), 49060-100, Aracaju - SE, Brasil.

endoribeiro@yahoo.com.br

ENDEREÇO COMPLETO DO AUTOR CORRESPONDENTE:

Camilla Muniz de Melo

Rodovia dos Náufragos, nº 8.750, Condomínio Morada do Rio, Rua A, Casa 340.

Bairro: Zona de Expansão Robalo

CEP: 49004-003.

Aracaju-SE.

RESUMO

O sucesso do tratamento endodôntico depende de um eficiente preparo químico-mecânico e uma correta obturação do sistema de canais radiculares. *Enterococcus faecalis* é uma das bactérias mais encontradas em infecções endodônticas persistentes. Dos medicamentos são exigidas propriedades biológicas e mecânicas, destacando sua atividade bactericida. **Objetivo:** avaliar a atividade antimicrobiana da *Aloe vera* isolada e em associação ao hidróxido de cálcio em *Enterococcus faecalis*, por meio do teste de microdiluição. **Materiais e métodos:** as folhas da *Aloe vera* passaram pelo processo de liofilização. Os grupos experimentais foram divididos em 05, sendo o controle (CTR) positivo e negativo, água destilada + *Aloe vera* (AA), água destilada + hidróxido de cálcio (HA) e, por último, hidróxido de cálcio + água destilada + *Aloe vera* (HAA). Foram testadas quatro cepas bacterianas clínicas de *Enterococcus faecalis*, além de uma linhagem padrão (ATCC), que passaram pelo processo de revitalização. Foi realizado o teste de microdiluição, onde os resultados foram observados em 12h, 24h, 48h e 72 horas. **Resultados:** o grupo HA mostrou efeito bactericida em uma espécie com CIM de 160µg/mL, efeito bacteriostático em duas com CIM de 20-40µg/mL, e em duas linhagens, incluindo a ATCC, não demonstraram nenhum efeito no período de 12 horas. O grupo AA apontou efeito bacteriostático em 12 horas com CIM desde 20-160µg/mL frente todas as linhagens testadas. No grupo HAA somente duas linhagens atingiram CIM de 320µg/mL constatando efeito bactericida em 12 horas. As demais espécies deste grupo não revelaram nenhum efeito nesse tempo experimental. **Conclusão:** foi constatado neste estudo que a associação da *Aloe vera* e o hidróxido de cálcio apresentou-se bactericida diante das cepas LMA 2 e LMA 3 de *Enterococcus faecalis*, exibindo CIM igual ou maior que 320µg/mL no período de 12 horas. No entanto, observou-se atividade bacteriostática na análise do grupo da *Aloe vera*, o qual revelou

maior êxito principalmente na concentração de 160µg/mL nas cepas LMA 3 e LMA 7B em 12 horas.

Descritores: *Aloe vera*; *Enterococcus faecalis*; hidróxido de cálcio.

ABSTRACT

The success of endodontic treatment depends on an efficient chemical-mechanical preparation and proper filling of the root canal system. *Enterococcus faecalis* is one of the bacteria most commonly found in persistent endodontic infections. Of medicines are required biological and mechanical properties, highlighting its bactericidal activity. **Objective:** To evaluate the antimicrobial activity of *Aloe vera* isolated and in combination with calcium hydroxide in *Enterococcus faecalis* by the microdilution test. **Materials and methods:** The leaves of the *Aloe vera* passed through the lyophilization process. Experimental groups were divided into 05, and the controller (CTR) positive and negative distilled water + *Aloe vera* (AA) Distilled + calcium hydroxide water (HA) and, finally, calcium hydroxide + distilled water + *Aloe vera* (HAA). Four clinical bacterial strains of *Enterococcus faecalis* were tested, plus a standard line (ATCC), which went through the process of revitalization. It was performed microdilution test, where the results were observed in 12h, 24h, 48h and 72 hours. **Results:** the HA group showed bactericidal effect on a species with MIC 160µg/mL, bacteriostatic effect in two with 20-40µg/ml MIC, and two strains, including ATCC, they showed no effect in 12 hours. The AA group pointed bacteriostatic effect in 12 hours with MIC from 20-160µg/mL across all tested strains. In the HAA group only two strains reached MIC 320µg/mL noting bactericidal effect in 12 hours. The

other species of this group did not show any effect in this experimental time.

Conclusion: It was found in this study that the combination of *Aloe vera* and calcium hydroxide presented is bactericidal against strains LMA LMA 2 and 3 of *Enterococcus faecalis*, exhibiting MIC equal to or greater than 320µg/mL in 12 hours. However, there was bacteriostatic activity analysis of *Aloe vera* group which proved most successful mainly on the concentration of 160µg/ml in strains LMA 3 and LMA 7B in 12 hours.

Descriptors: *Aloe vera*; calcium hydroxide; *Enterococcus faecalis*.

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da preparação mecânica, irrigação, controle microbiano e preenchimento completo do sistema de canais radiculares.^{1,2} Este é um tratamento previsível e confiável com altas taxas de sucesso variando de 86% a 98%.^{4,5} No entanto, por uma variedade de razões, o insucesso endodôntico ainda ocorre, e a presença de sinais clínicos juntamente com evidências radiográficas de destruição óssea periapical indicam a necessidade de retratamento.^{6,7}

Os microorganismos infectantes podem sobreviver dentro do canal radicular a procedimentos endodônticos⁸, devido a complexidades e limitações de acesso por instrumentos e substâncias irrigantes.⁹ Uma das principais causas para o fracasso do tratamento de canais radiculares é a presença de microbiota facultativa, persistentes ao preparo químico-cirúrgico, e, espécies resistentes da cavidade oral como *Enterococcus faecalis*¹⁰, que pode infiltrar-se por meio de um selamento temporário insatisfatório no período compreendido entre as sessões do tratamento endodôntico.⁸ Portanto, a utilização de um curativo no canal radicular torna-se importante para obtenção e

manutenção de um canal desinfectado após a instrumentação mecânica, antes e após à obturação do canal.^{2,10,11}

Enterococcus faecalis é uma das bactérias mais resistentes encontradas em canais radiculares infectados, especialmente em casos de lesão periapical persistente.¹² São cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos associados a infecções endodônticas persistentes¹³, cuja característica distintiva é a sua capacidade de crescer em pH alcalino que normalmente inibe outras bactérias.¹⁴ Sua habilidade de invadir túbulos dentinários¹⁵, juntamente com de formar biofilmes torna essa bactéria resistente à fagocitose, anticorpos e agentes antimicrobianos.¹⁶ Por essa razão, é um dos microrganismos mais amplamente estudado na área da Endodontia.¹⁷

Hidróxido de cálcio é o material padrão para o tratamento de canais radiculares, sendo amplamente utilizado na Endodontia¹⁸, possui propriedades: antimicrobiana^{19, 20}, de bloqueio mecânico para evitar a reinfecção do canal²¹, limita a reabsorção radicular²², induz formação de tecido mineralizado²² e promove a reparação dos tecidos periapicais e adjacentes.²³ Seu mecanismo de ação antimicrobiano é influenciado pela velocidade da sua dissociação em íons hidroxila e íons cálcio²⁴ e pela inativação de enzimas das membranas citoplasmáticas dos microrganismos, causando efeitos tóxicos nas células bacterianas.²⁵

O interesse pelo uso de remédios à base de plantas em endodontia tem crescido recentemente. É suposto que ervas medicinais sejam eficazes no tratamento de doenças infecciosas, pois são biocompatíveis e suavizam os efeitos colaterais de antimicrobianos sintéticos.²⁶ *Aloe vera* é uma planta da família *liliaceae*, do gênero *Aloe* comumente conhecida como “babosa” e, apresenta propriedades cicatrizante, antibacteriana, antifúngica e antivirótica.²⁷ Segundo Kaithwas *et al.*²⁸ (2008), a *Aloe vera* tem

propriedades antimicrobianas contra várias espécies de microrganismos, incluindo *Enterococcus faecalis*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este trabalho apresenta como objetivo geral avaliar a atividade antimicrobiana da *Aloe vera* isolada e em associação ao hidróxido de cálcio em *Enterococcus faecalis*, por meio do teste de microdiluição.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da *Aloe vera* isolada ou associada ao hidróxido de cálcio sob o *Enterococcus faecalis*, por meio do teste de microdiluição em 12 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas.

- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das diferentes linhagens de *Enterococcus faecalis* frente às medicações testadas em diferentes intervalos de tempo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação do gel e liofilização da *Aloe Vera*

As folhas da *Aloe vera* foram adquiridas no estado de Sergipe/Brasil e levadas ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) no setor herbário no qual passou pelo processo de identificação e ganhou voucher de número

ASE-37.261. O gel da planta foi retirado de suas folhas com comprimento entre 25 a 30 cm, as quais foram cortadas a cerca de 05 cm do talo, lavadas em água corrente e mantidas em água destilada por 24 horas.²⁹ Este gel foi obtido por meio de raspagem do parênquima, filtrado, armazenado em coletor estéril enrolado em papel filme, levado ao freezer onde permaneceu até o congelamento em torno de -18° a -25°.

Em seguida, toda amostra obtida das folhas foi levada ao Departamento de Farmácia da UFS, onde passou pelo processo de liofilização em que ocorre retirada toda a água do gel mucilaginoso do estado sólido diretamente para o estado gasoso restando somente a parte sólida.

Divisão dos Grupos Experimentais

A medicação intracanal analisada é o hidróxido de cálcio (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil) por ser a mais utilizada na clínica endodôntica e o veículo selecionado para o preparo desta foi a água destilada (Eurofarma Laboratórios LTDA, SP, Brasil). Para facilitar a análise, os grupos foram divididos conforme descrito no Quadro 1. A pasta da *Aloe vera* foi manipulada separadamente na proporção de 40mg para 1mL e, acrescida ao hidróxido de cálcio quando necessário. Em estudo piloto anterior³⁰ verificou a quantidade necessária de água destilada para dissolver todo o pó da *Aloe vera* e formar uma consistência de pasta.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Obtenção das linhagens de microorganismos

No presente estudo foram testadas quatro cepas bacterianas clínicas de *Enterococcus faecalis* isoladas de pacientes acometidos por infecção endodôntica, essas bactérias pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Aplicada da

Universidade Federal de Sergipe (LMA/DMO/UFS), além de uma linhagem padrão, procedente da American Type Culture Collection (ATCC 29212) gentilmente cedida pelo INCQS/Fiocruz-RJ (Quadro 2).

Revitalização das linhagens testes

As linhagens de *E. faecalis* supracitadas foram revitalizadas para uso nos testes de sensibilidade microbiana. As cepas foram inoculadas em tubos de ensaio de vidro (12 mm diâmetro x 75 mm de comprimento, TWA – Byosystems, Santa Cândida/PR, Brasil) contendo 3ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth – OXOID Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e incubadas em estufa de cultivo microbiológico (Câmara Incubadora B.O.D. MA 415/S, Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda., Piracicaba/SP, Brasil) à temperatura de 37°C por 24 horas.

A subcultura (repique) dos microorganismos foi realizada após 24 horas em placas de Petri de vidro estéreis (medição 20x150 mm) contendo *ágar bile esculina* (Bile esculin Ágar –BBL – Interlab Distribuidora de Produtos Científicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e *ágar nutriente* (Ágar Nutrient – HIMEDIA – SP LABOR Equipamentos para Laboratórios Ltda., Presidente Prudente/SP, Brasil), para assegurar sua pureza e viabilidade.

Teste de microdiluição

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) impede o crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo. Este método é usado para determinar a concentração mínima de um agente a fim de inibir sua reprodução ou eliminar microorganismos. A CIM bactericida provoca a morte dos

microorganismos; a CIM bacteriostática inibe a reprodução bacteriana, não provocando a morte dos mesmos.

Os testes de microdiluição foram baseados no protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2005) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que consistem na elaboração da suspensão microbiana ajustada para uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC em caldo Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Broth – HIMEDIA – SP LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil) estéril tamponado com Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg). Essa técnica compreende o uso de pequenos volumes de meio de cultura líquido colocados em placas estéreis de 96 poços (CRAL Artigos para Laboratório Ltda., Cotia/SP, Brasil).

As suspensões bacterianas foram preparadas, inoculadas em tubos de ensaio contendo 5mL de solução salina estéril 0,145mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) e, homogeneizadas em agitador de tubos vórtex (MODELO MA 162, Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba/SP, Brasil) durante 15 segundos. A densidade celular foi ajustada com o auxílio do cartão de Wickman (+/- 0,5) para alcançar o padrão 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL).

As medicações testadas foram preparadas numa concentração de 5120µg/mL, denominada de solução padrão, na proporção: 2560µg de hidróxido de cálcio, 2560µg de *Aloe vera* com 100mL de água destilada estéril para ambos. No protocolo utilizado obtiveram-se as seguintes concentrações: 640µg/mL, 320µg/mL, 160µg/mL, 80µg/mL, 40µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL, 2,5µg/mL, 1,25µg/mL, 0,625µg/mL.

Para padronização do teste utilizou-se controles negativo e positivo. Os poços referentes ao controle negativo foram preenchidos com 100µL de ampicilina numa concentração de 50µg/mL, tendo como solvente a água destilada autoclavada. Nos

poços correspondentes ao controle positivo depositou-se 100µL do caldo Mueller-Hinton adicionados aos 100µL das diluições 1:20 das linhagens de *E. faecalis*. Todo o experimento foi realizado em triplicata, analisado por um examinador previamente calibrado, e, no modelo de estudo experimental *in vitro*, controlado e cego. Os resultados avaliados foram descritivos e qualitativos segundo a escala CLSI (2005) em 12h, 24h, 48h e 72 horas (Quadro 3).

RESULTADOS

Em 12 horas, na placa com apenas *Aloe vera*, as linhagens LMA 3 e LMA 7B apresentaram as maiores CIM na concentração de 160µg/mL. Já as bactérias LMA 2 e LMA 4 exibiram a CIM na concentração de 40µg/mL. E a cepa padrão, ATCC, foi a que demonstrou a menor CIM, na concentração de 20µg/mL (Gráfico 1). Todas as linhagens desse grupo apresentaram efeito bacteriostático.

Na placa de hidróxido de cálcio isolado, em 12 horas, a linhagem LMA 2 exibiu a CIM mais alta com a concentração de 160µg/mL, obtendo um efeito biológico bactericida, ou seja, para essa linhagem houve eliminação total. As bactérias LMA 4 demonstraram a menor CIM na concentração de 20µg/mL, logo após as da LMA 3, que apresentaram a CIM na concentração de 40µg/mL, ambas tiveram efeito biológico bacteriostático. As cepas LMA 7B e ATCC não obtiveram efeito em 12 horas, atingindo assim a CIM em concentrações maiores de 640µg/mL (Gráfico 2).

Na associação da *Aloe vera* com hidróxido de cálcio, as cepas LMA 2 e LMA 3 atingiram a segunda maior CIM constatando efeito biológico bactericida na concentração de 320µg/mL em 12 horas. As linhagens LMA 4, LMA 7B e ATCC não

revelaram nenhum efeito nesse tempo experimental, sendo assim, exprimiram CIM maiores que 640µg/mL (Gráfico 3).

Em relação à maior concentração bactericida em toda a pesquisa, o grupo da união da *Aloe vera* com hidróxido de cálcio exibiu maior eficácia com concentração 320µg/mL. Entretanto, no concernente a atividade bacteriostática o grupo da *Aloe vera* revelou maior êxito principalmente na concentração de 160µg/mL. Nos tempos experimentais restantes (24, 48 e 72 horas), as substâncias testadas não desempenharam nenhuma ação sobre as linhagens das bactérias estudadas.

Em todos os grupos, os poços de controle negativo apresentaram-se límpidos diferentemente aos do controle positivo que expressaram turvidade acentuada, isto é, representando crescimento total das bactérias. Todos os outros poços pesquisados que mostraram resultados significativos turvaram em algum gradiente, sendo esses analisados por especialista da área através da avaliação visual das placas.

DISCUSSÃO

Enterococcus faecalis é uma espécie bacteriana frequentemente encontrada em canais endodônticos obturados.³¹ Do ponto de vista microbiológico, apresenta poucas exigências para sobrevivência, sendo capaz de crescer em temperaturas de 10 a 45°C e pH 9,5.^{31,32} Estudo *in vitro* afirma que a elevação do pH em 8,5 aumenta a habilidade de adesão ao colágeno de *E. faecalis*, podendo este ser o mecanismo crítico pelo qual esse microorganismo predomina em infecções endodônticas secundárias ou persistentes.³³

O teste de microdiluição é um método muito eficaz para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, o qual determina CIM das plantas. Entretanto, vários fatores interferem nos resultados, tais como, técnica aplicada, microorganismos, cepas utilizadas, origem da planta, época da coleta, quantidade de extrato testado e forma de preparo a partir de plantas secas ou frescas.³⁴ Segundo Ostrosky *et al.*³⁵ (2008), este método é considerado confiável por fornecer resultados quantitativos e não ser influenciado pela velocidade do crescimento bacteriano. Um ponto a ser ressaltado como desvantagem, refere-se à dificuldade na detecção de contaminação no caso de testes de materiais clínicos.³⁶

O pH influencia neste método, pois este altera o crescimento microbiano, a atividade e estabilidade das substâncias testadas. Em estudo *in vitro* associando *Aloe vera* na forma de gel mucilaginoso ao hidróxido de cálcio utilizando dentes humanos obteve valores de pH em torno de 7,0.^{37,38} Em contrapartida, outro estudo atingiu valores de pH 13,14.³⁰ Esta inconsonância pode ter ocorrido pelo fato da amostra da *Aloe vera* do primeiro estudo ter sido em gel mucilaginoso composto por 99,5% de água e o segundo em pó, através da liofilização, composta pelos princípios ativos e farmacológicos da planta.^{37,38}

A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio é atribuída à velocidade variável de dissociação dos íons hidroxila e cálcio promovidas pelos diferentes veículos.³⁹ Esse medicamento é capaz de inativar nas paredes celulares das bactérias os efeitos tóxicos das endotoxinas produzidas pelos lipopolissacarídeos (LPS).⁴⁰ Entretanto não exibe efeito bactericida sobre a *E. faecalis*, a qual sobrevive nos túbulos dentinários após longos períodos de terapia à base de hidróxido de cálcio.^{41,42,43} Em contrapartida, nesse estudo o grupo referente apenas ao hidróxido de cálcio mostrou efeito bactericida em uma espécie com CIM de 160µg/mL, efeito bacteriostático em duas com CIM de 20-

40µg/mL, e em duas linhagens, incluindo a ATCC, não demonstraram nenhum efeito no período de 12 horas.

A *Aloe vera* dispõe de compostos específicos, entre eles a antraquinona, que inibe o transporte de líquido para a membrana da célula contaminada⁴⁴, principal responsável pela sua atividade antimicrobiana.⁴⁵ Essa ação ocorre principalmente contra as bactérias Gram-positivas por ser constituída de uma única parede celular, enquanto que a da Gram-negativa é uma estrutura de múltiplas paredes e bastante complexa.⁴⁶ O grupo referente à *Aloe vera* isolada apontou efeito bacteriostático em 12 horas com CIM desde 20-160µg/mL frente todas as linhagens testadas. Estudo realizado por Semenoff *et al.*⁴⁷ (2008) corrobora com nossos resultados obtendo inibição do crescimento da *E. faecalis* quando utilizado o gel de *Aloe vera*, apesar de utilizar outra metodologia.

As linhagens ATCC denotaram um comportamento desigual das isoladas de pacientes acometidos por infecção endodôntica, acreditando que após tantas utilizações em pesquisas microbiológicas, aquelas sofreram maiores processos laboratoriais tornando-se mais sensíveis e menos resistentes. As ATCCs são cepas destinadas a um controle de qualidade bacteriológico, procedentes de um banco de dados internacional - (American Type Culture Collection) exibindo identificação do organismo, da isolamento e do depositador. Além disso, suas respostas são disponíveis nos diversos testes laboratoriais, entre eles, morfologia, reação tintorial à Gram, bioquimismo e a resposta à antibióticos.^{47,48,49,50,51}

As associações com *Aloe vera* visam facilitar o uso do hidróxido de cálcio, melhorar a capacidade antimicrobiana, possibilitar a difusão de íons através dos túbulos dentinários, ajudar na radiopacidade, biocompatibilidade e textura do material.³⁷ Nessa associação somente duas linhagens atingiram CIM de 320µg/mL constatando efeito bactericida em 12 horas. As demais espécies não revelaram nenhum efeito nesse tempo

experimental. Sendo assim, podemos sugerir que há um predomínio da atividade do hidróxido de cálcio sobre os componentes ativos da *Aloe vera* pelo fato de que apenas o hidróxido de cálcio exibiu resultados bactericidas sobre as cepas.

Conforme a ANVISA, estudos bacteriológicos necessitam de avaliação em 12h, 24h e 48h. No entanto, utilizamos o tempo de 72h pela circunstância da prática clínica endodôntica já que as medicações intracanaís utilizadas passam pelo menos 72h dentro do sistema de canais radiculares. Em nossa pesquisa não obtivemos resultados relevantes nos tempos experimentais de 24h, 48h e 72 horas, certamente porque a CIM alcança um valor superior a 640µg/mL recusando o método aplicado.

Estudos antimicrobianos *in vitro* são essenciais antes da prática clínica endodôntica, pois geram conhecimento e potencializam modificações na estrutura das substâncias. No entanto, a extrapolação desses resultados é limitada, porque ensaios laboratoriais não reproduzem a realidade dos fatores intrínsecos de estudos *in vivo*. Desta forma, outros estudos e ensaios clínicos são necessários para comprovar a real efetividade das substâncias testadas uma vez assegurada sua biocompatibilidade.

CONCLUSÃO

Diante da metodologia utilizada observou-se que a associação da *Aloe vera* e o hidróxido de cálcio apresentou ação bactericida. Entretanto, exibiu efeito bacteriostático quando a planta foi avaliada isoladamente. Frente às linhagens estudadas, essa associação mostrou potencial inibitório para as cepas LMA 2 e LMA 3 de *Enterococcus faecalis* com CIM igual ou maior que 320µg/mL, no período de 12 horas. No entanto,

quando analisada separadamente, a *Aloe vera* revelou maior êxito principalmente na concentração de 160µg/mL nas cepas LMA 3 e LMA 7B em 12 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson, RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 243-248.
- 2- El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 560-569.
- 3- Friedman S, Abitbol S, Lawrence HP. Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study—phase 1: initial treatment. *J Endod* 2003; 29: 787–93.
- 4- Setzer FC, Boyer KR, Jeppson JR, Karabucak B, Kim S. Long-term prognosis of endodontically treated teeth: a retrospective analysis of preoperative factors in molars. *J Endod* 2011; 37: 21–5.
- 5- De Cleen MJ, Schuurs AH, Wesselink PR, Wu MK. Periapical status and prevalence of endodontic treatment in an adult Dutch population. *Int Endod J* 1993; 26: 112–9.
- 6- Barbizam JV, Fariniuk LF, Marchesan MA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Effectiveness of manual and rotary instrumentation techniques for cleaning flattened root canals. *J Endod* 2002; 28: 365–6.
- 7- Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LSW. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 756-761.
- 8- Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 2007; 33: 917-925.

- 9- Gomes JA, Pedroso RC, Jacinto et al. "In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers," Brazilian Dental Journal 2004; vol. 15, no. 1, pp. 30–35
- 10- Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. Int Endod J 1992; 25: 97-106.
- 11- Basrani B, Tjaderhane L, Santos M, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 96: 618-624.
- 12- Sakamoto M, Siqueira JJr, Roças I, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. Oral Microbiol Immun 2008; 23: 275–81.
- 13- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998; 85(1): 86-93. doi:10.1016/S1079-2104(98)90404-8
- 14- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 2002; 35: 221-228.
- 15- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006; 32: 93–8.
- 16- Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod 2002; 28(10): 689-93. doi:10.1097/00004770-200210000-00003
- 17- Rezende GC, Massunari L, Queiroz IOA, Gomes-Filho JE, Jacinto RC, Lodi CS, Dezan-Júnior E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers

- after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Braz Oral Res* [online] 2016; 30(1): e38. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0038
- 18- Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, Casaroto AR, Garcia RB, Moraes IG et al. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *J Appl Oral Sci* 2010; 18: 621-624.
- 20- Vianna ME, Zilio DM, Ferraz CC, Zaia AA, de Souza-Filho FJ, Gomes, BP. Concentration of hydrogen ions in several calcium hydroxide pastes over different periods of time. *Braz Dent J* 2009; 20: 382-388.
- 21- Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, de Martin AS, Gomes BP, Motta RH et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *Eur J Dent* 2011; 5: 1-7.
- 22- Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol* 2012; 28: 320-323.
- 23- Duarte MA, Demarchi AC, Giaxa MH, Kuga MC, Fraga SC, de Souza LC. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *J Endod* 2000; 26: 389-390.
- 24- Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 608-613.
- 25- Estrela C, Rodrigues de Araújo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001; 27: 720-723.

- 26- Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 80–4.
- 27- Kuzuya H, Tamai I, Beppu H, Shimpo K, Cihara T. Determination of aloenin, barbaloin and isobarbaloin in Aloe species by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography* 2001; 752: 91-97.
- 28- Kaithwas G, Kumar A, Pandey H et al. Investigation of comparative antimicrobial activity of Aloe vera gel and juice. *Pharmacologyonline* 2008; 1: 239–43.
- 29- Fé JLM, Coelho CA, Damascena GM, Soares IMV, Alves FR, Santos IMSP, Carvalho CMRS. Aloe vera as vehicle to mineral trioxide aggregate: study in bone repair. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2014; 43(5): 299-304.
- 30- Júnior JP. "Análise do pH de pastas endodônticas associadas à Aloe vera". Trabalho de conclusão de curso de graduação em Odontologia. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju/SE - Brasil. 2015.
- 31- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:234-9.
- 32- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
- 33- Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:308-20.
- 34- Fennel CW, Lindsey KL, Mc Gaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, Grace OM, Van Staden J 2004. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol* 94: 205-217.
- 35- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneka TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração

mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia 2008; 18(2): 301-307

36 - Sahm DF, Washington II JA. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 1991. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116.

37 - Batista VE, Olian DD, Mori, GG. Diffusion of Hydroxyl Ions from Calcium Hydroxide and Aloe vera Pastes. Brazilian Dental Journal 2014; 25(3): 212-216.

38 - Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide . Journal of Endodontics. 1993; v. 19, p. 302-306.

39 - Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 80:459-464.

40- Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. J Appl Oral Sci. 2004; 12 (2):93-8.

41- Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. Revista de Odontologia da UNESP. 2007; 36(2): 163-68

42- Lui JN, Sae-Lim V, Song KP, Chen NN. In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on Enterococcus faecalis. Int Dent J. 2004; 37:105-13.

43- Segdley CM, Lennal SL, Appelbe OK. Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. Int Endod J. 2005; 38:735-42.

44- Ramos AP, Pimentel LC. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização. Braz J Health. 2011; 1: 40-48.

- 45- Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 161–170.
- 46- Alemdar S, Agaoglu S. Investigation of in vitro antimicrobial activity of aloe vera juice. *J Anim Vet Adv* 2009; 8: 99–102.
- 47- Semenoff TAV, Ferreira WRS, Semenoff-segundo A, Biasoli ER. Efetividade in vitro de Aloe vera in natura, gel de clorexidina a 0,12% e gel de clorexidina a 2% sobre *Enterococcus faecalis*, *Revista Odonto Ciências*. 2008; 23(3): 283-286.
- 48- Só MVR, Wagner MH, da Rosa RA, Telles L, Colpani F, Henz S, Magro ML. Atividade antimicrobiana in vitro de uma suspensão de própolis frente ao *Enterococcus faecalis*. *RFO, Passo Fundo* 2011 set./dez; v. 16, n. 3, p. 277-281
- 49- Costa EMM, Barbosa AS, de Arruda TA, de Oliveira PT, Dametto FR, de Carvalho RA, Melo MD. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *J Bras Patol Med Lab* 2010 jun.; v. 46, n. 3, p. 175-180
- 50- Fagundes FS, Leonardi DP, Haragushiku GA, Filho FB, Tomazinho LF, Tomazinho PH. Eficiência de diferentes soluções na descontaminação de cones de guta-percha expostos ao *Enterococcus faecalis*. *Revista Sul-brasileira de Odontologia*. 2005; v. 2, n. 2
- 51- Silva FC et al. Análise da efetividade da instrumentação associada à Terapia fotodinâmica antimicrobiana e a medicação intracanal na eliminação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent Sci* 2010 jan./jun.; 13 (5) 31-38

QUADROS

Quadro 1. Descrição dos grupos e das proporções das substâncias analisadas na pesquisa.

Grupos	Substâncias	Dosagem
CTR (controle positivo)	Caldo Muller-Hinton Suspensão bacteriana	100µl 1:20
CTR (controle negativo)	Ampicilina Água destilada	50µg 1mL
AA	<i>Aloe vera</i> Água destilada	40mg 1mL
HA	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada	1g 1.1mL
HAA	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada <i>Aloe vera</i>	1g 2,1mL 40mg

Quadro 2. Linhagens de *E. faecalis* disponibilizadas para uso em pesquisa pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (LMA/DMO/UFS).

Espécie	Linhagens
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMA 2 (14/C/4/4), LMA 3 (22/C/4/4), LMA 4 (20/A/1/1) e LMA 7B (22/C/1/5)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212

Quadro 3. Escala de turvação relacionada ao crescimento microbiológico conforme CLSI, 2005.

Escala de turvação/ crescimento microbiológico	
Escala 0	Ausência de crescimento nos poços.
Escala 1	Leve turbidez quando comparado com o controle positivo.
Escala 2	Proeminente decréscimo na turbidez quando comparado com o controle positivo.
Escala 3	Leve redução na turbidez quando comparado com o controle positivo.
Escala 4	Não há redução na turbidez quando comparado com o controle positivo.

GRÁFICOS

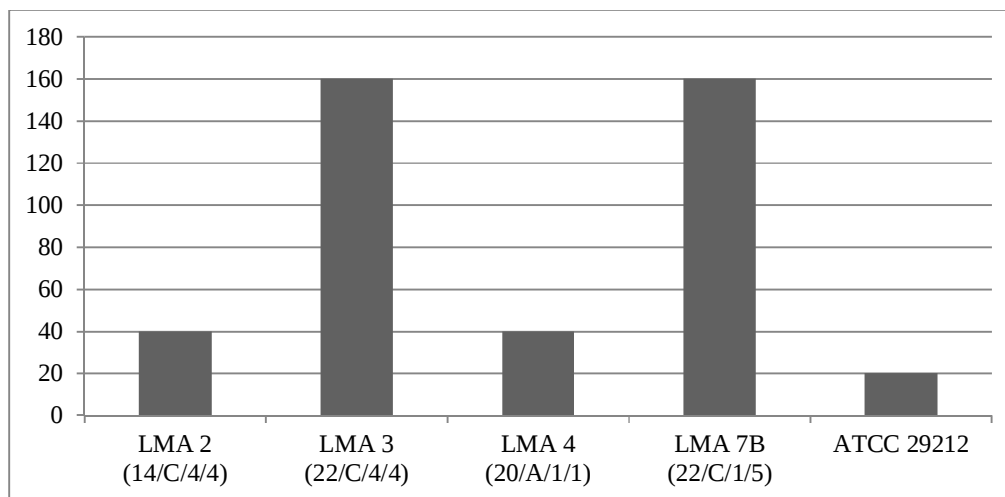


Gráfico 1. Concentração Inibitória Mínima em µg/mL da *Aloe vera* em 12 horas.

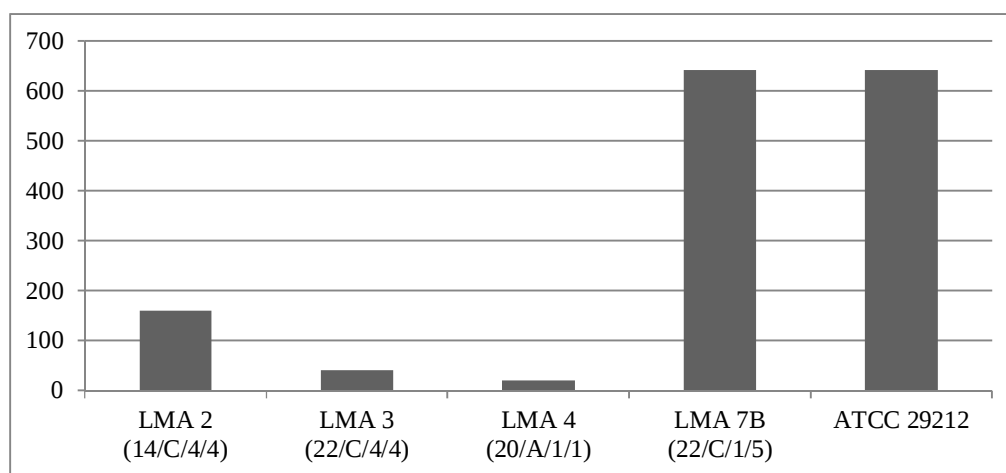


Gráfico 2. Concentração Inibitória Mínima em µg/mL do Hidróxido de Cálcio em 12 horas.

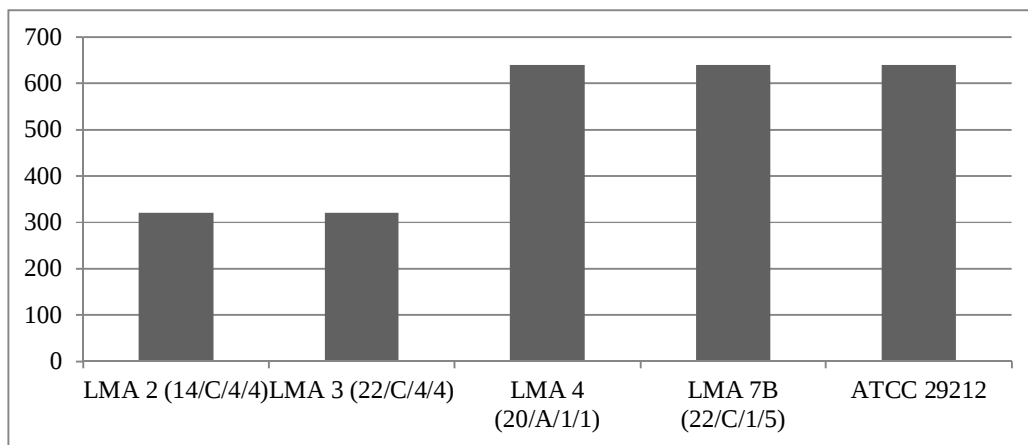


Gráfico 3. Concentração Inibitória Mínima em µg/mL da associação da *Aloe vera* com Hidróxido de cálcio em 12 horas.

II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

REVISTA DE ODONTOLOGIA DA UNESP

Instruções aos Autores

1. ESCOPO E POLÍTICA

A Revista de Odontologia da UNESP tem como missão publicar artigos científicos inéditos de pesquisa básica e aplicada, de divulgação e de revisão de literatura que constituam avanços do conhecimento científico na área de Odontologia, respeitando os indicadores de qualidade.

ITENS EXIGIDOS PARA A APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

- Os artigos enviados para publicação devem ser inéditos e não ter sido submetidos simultaneamente a outro periódico. A Revista de Odontologia da UNESP reserva-se todo o direito autoral dos trabalhos publicados, inclusive tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição com a devida citação da fonte.
- Podem ser submetidos artigos escritos em português e em inglês. O texto em inglês deve vir acompanhado de documento que comprove que a revisão foi realizada por profissionais proficientes na língua inglesa.
- A Revista de Odontologia da UNESP tem publicação bimestral e tem o direito de submeter todos os artigos a um corpo de revisores, totalmente autorizados para decidir pela aceitação, ou para devolvê-los aos autores com sugestões e modificações no texto, e/ou para adaptação às regras editoriais da revista.
- Os conceitos afirmados nos trabalhos publicados são de inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor Científico ou do Corpo Editorial.
- As datas do recebimento do artigo, bem como sua aprovação, devem constar na publicação.

CRITÉRIOS DE ANÁLISE DOS ARTIGOS

- Os artigos são avaliados primeiramente quanto ao cumprimento das normas de publicação.
- Os artigos que estiverem de acordo com as normas são avaliados por um Editor de Área, que o encaminha ao Editor Científico para uma análise quanto à adequação ao escopo e quanto a critérios mínimos de qualidade científica e de redação. Depois da análise, o Editor Científico pode recusar os artigos, com base na avaliação do Editor de Área, ou encaminhá-los para avaliação por pares.
- Os artigos aprovados para avaliação pelos pares são submetidos à análise quanto ao mérito e método científico por, no mínimo, dois revisores; mantendo-se sigilo total das identidades dos autores.
- Quando necessária revisão, o artigo é devolvido ao autor correspondente para as alterações, mantendo-se sigilo total das identidades dos revisores. A versão revisada é

ressubmetida, pelos autores, acompanhada por uma carta resposta (*cover letter*), explicando cada uma das alterações realizadas no artigo a pedido dos revisores. As sugestões que não forem aceitas devem vir acompanhadas de justificativas convincentes. As alterações devem ser destacadas no texto do artigo em negrito ou em outra cor. Quando as sugestões e/ou correções forem feitas diretamente no texto, recomendam-se modificações nas configurações do Word, para que a identidade do autor seja preservada. O artigo revisado e a carta resposta são, inicialmente, avaliados pelo Editor Científico, que os envia aos revisores, quando solicitado.

- Nos casos de inadequação da língua portuguesa ou inglesa, uma revisão técnica por um especialista é solicitada aos autores.
- Nos casos em que o artigo for rejeitado por um dos dois revisores, o Editor Científico decide sobre seu envio para a análise de um terceiro revisor.
- Nos casos de dúvida sobre a análise estatística, esta é avaliada pelo estatístico consultor da revista.
- Depois da aprovação quanto ao mérito científico, os artigos são submetidos à análise final somente da língua portuguesa (revisão técnica) por um profissional da área.

CORREÇÃO DAS PROVAS DOS ARTIGOS

- A prova final dos artigos é enviada ao autor correspondente através de *e-mail* com um *link* para baixar o artigo diagramado em PDF para aprovação final.
- O autor dispõe de um prazo de 72 horas para correção e devolução do original devidamente revisado, se necessário.
- Se não houver retorno da prova em 72 horas, o Editor Científico considera como final a versão sem alterações, e não são mais permitidas maiores modificações. Apenas pequenas modificações, como correções de ortografia e verificação das ilustrações, são aceitas. Modificações extensas implicam a reapreciação pelos revisores e atraso na publicação do artigo.
- A inclusão de novos autores não é permitida nessa fase do processo de publicação.

2. FORMA E PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS

Todos os manuscritos devem vir, obrigatoriamente, acompanhados da **Carta de Submissão**, do **Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição**, como também da **Declaração de Responsabilidade**, da **Transferência de Direitos Autorais** e da **Declaração de Conflito de Interesse** (documento explicitando presença ou não de conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho científico) assinada pelo(s) autor(es) (modelos anexos). O manuscrito deve ser enviado em dois arquivos: um deles deve conter somente o título do trabalho e respectivos autores; o outro, o artigo completo sem a identificação dos autores.

Preparação do Artigo

O texto, incluindo resumo, *abstract*, tabelas, figuras e referências, deve estar digitado no formato *Word for Windows*, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, espaço duplo, margens laterais de 3 cm, superior e inferior com 2,5 cm, e conter um total de 20 laudas,

incluindo as figuras, tabelas e referências. Todas as páginas devem estar numeradas a partir da página de identificação.

1. Página de identificação

A página de identificação deve conter as seguintes informações:

- títulos em português e em inglês devem ser concisos e refletir o objetivo do estudo;
- nomes por extenso dos autores (sem abreviatura), com destaque para o sobrenome (em negrito ou em maiúsculo) e na ordem a ser publicado; nomes do departamento e da instituição aos quais são afiliados (somente uma instituição), com a respectiva sigla da instituição (UNESP, USP, UNICAMP, etc.); CEP (Código de Endereçamento Postal); cidade e país (Exemplo: Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia, UNESP Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil);
- endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçado, incluindo telefone, fax e e-mail;
- *e-mail* de todos os autores.

2. Resumo e Abstract

Todos os tipos de artigos (pesquisa básica e aplicada, de divulgação e de revisão de literatura) devem conter RESUMO e ABSTRACT precedendo o texto, com o máximo de 250 palavras, estruturado em seções: introdução; objetivo; material e método; resultado; e conclusão. Nenhuma abreviação ou referência (citação de autores) deve estar presente.

3. Descritores/Descriptors

Indicar os Descritores/*Descriptors* com números de 3 a 6, identificando o conteúdo do artigo, e mencioná-los logo após o RESUMO e o ABSTRACT. Para a seleção dos Descritores/*Descriptors*, os autores devem consultar a lista de assuntos do *MeSH Data Base* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) e os Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (<http://decs.bvs.br/>). Deve-se utilizar ponto e vírgula para separar os descritores/*descriptors*, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula.

Exemplos: Descritores: Resinas compostas; dureza.

Descriptors: Photoelasticity; passive fit.

4. Ilustrações e tabelas

As ilustrações (figuras, gráficos, desenhos, etc.), consideradas no texto como figuras e limitadas ao mínimo indispensável, devem ser adicionadas em arquivos separados. Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto. As figuras devem estar em cores originais, digitalizadas em formato tif, gif ou jpg, com no mínimo 300dpi de resolução, 86 mm (tamanho da coluna) ou 180 mm (tamanho da página inteira). As legendas correspondentes devem ser claras, concisas (não muito extensas, com exceções, quando necessário) e listadas no final do trabalho. As tabelas devem ser organizadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, e a legenda deve ser colocada na parte superior. As tabelas devem ser abertas nas laterais (direita e esquerda). As notas de rodapé devem ser indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

5. Citação de autores no texto

A citação dos autores no texto pode ser feita de duas formas:

- Numérica

Exemplo: Radiograficamente, é comum observar o padrão de “escada”, caracterizado por uma radiolucidez entre os ápices dos dentes e a borda inferior da mandíbula.^{6,10,11,13} (ordem numérica). As referências devem ser citadas de forma sobrescrita e em ordem ascendente.

– **Alfanumérica**

- um autor: Ginnan⁴ (2006)
- dois autores: separados por vírgula - Tunga, Bodrumlu¹³ (2006)
- três autores ou mais de três autores: o primeiro autor seguido da expressão et al. - Shipper et al.² (2004)

Exemplo: As técnicas de obturação utilizadas nos estudos abordados não demonstraram ter tido influência sobre os resultados obtidos, segundo Shipper et al.² (2004) e Biggs et al.⁵ (2006). Shipper et al.² (2004), Tunga, Bodrumlu¹³ (2006) e Wedding et al.¹⁸ (2007), [...]

6. Referências

As Referências devem seguir os requisitos da *National Library of Medicine* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). Os títulos dos periódicos devem ser referidos de forma abreviada, sem negrito, itálico ou grifo, de acordo com o *Journals Data Base* (PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), e, para os periódicos nacionais, verificar o Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde da Bireme (<http://portal.revistas.bvs.br/?lang=pt>). Todas as referências devem ser citadas no texto; devem também ser ordenadas e numeradas na mesma sequência em que aparecem no texto. A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo. Citar apenas as referências relevantes ao estudo. Referências à comunicação pessoal, trabalhos em andamento, artigos *in press*, resumos, capítulos de livros, dissertações e teses não devem constar da listagem de referências. Quando essenciais, essas citações devem ser registradas no rodapé da página do texto em que são mencionadas.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

ARTIGOS DE PERIÓDICOS

Duane B. Conservative periodontal surgery for treatment of intrabony defects is associated with improvements in clinical parameters. *Evid Based Dent*. 2012;13(4):115-6.

Litonjua LA, Cabanilla LL, Abbott LJ. Plaque formation and marginal gingivitis associated with restorative materials. *Compend Contin Educ Dent*. 2012 Jan;33(1):E6-E10.

Sutej I, Peros K, Benutic A, Capak K, Basic K, Rosin-Grget K. Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking. *Oral Health Prev Dent*. 2012;10(4):397-403.

Tawil G, Akl FA, Dagher MF, Karam W, Abdallah Hajj Hussein I, Leone A, et al. Prevalence of IL-1beta+3954 and IL-1alpha-889 polymorphisms in the Lebanese population and its association with the severity of adult chronic periodontitis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Oct-Dec;26(4):597-606.

Goyal CR, Klukowska M, Grender JM, Cunningham P, Qaqish J. Evaluation of a new multi-directional power toothbrush versus a marketed sonic toothbrush on plaque and gingivitis efficacy. *Am J Dent*. 2012 Sep;25 Spec No A(A):21A-26A.

Caraivan O, Manolea H, Corlan Puşcu D, Fronie A, Bunget A, Mogoantă L. Microscopic aspects of pulpal changes in patients with chronic marginal periodontitis. Rom J Morphol Embryol. 2012;53(3 Supl):725-9.

LIVROS

Domitti SS. Prótese total articulada com prótese parcial removível. São Paulo: Santos; 2001.

Todescan R, Silva EEB, Silva OJ. Prótese parcial removível : manual de aulas práticas disciplina I. São Paulo: Santos ; 2001.

Gold MR, Siegal JE, Russell LB, Weintein MC, editors. Cost-effectiveness in health and medicine. Oxford: Oxford University Press; 1997.

PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTRO DE ENSAIOS CLÍNICOS

- Procedimentos experimentais em animais e em humanos

Estudo em Humanos: Todos os trabalhos que relatam experimentos com humanos, ou que utilizem partes do corpo ou órgãos humanos (como dentes, sangue, fragmentos de biópsia, saliva, etc.), devem seguir os princípios éticos estabelecidos e ter documento que comprove sua aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (registrado na CONEP) da Instituição do autor ou da Instituição em que os sujeitos da pesquisa foram recrutados, conforme Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Estudo em animais: Em pesquisas envolvendo experimentação animal, é necessário que o protocolo tenha sido aprovado pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Instituição do autor ou da Instituição em que os animais foram obtidos e realizado o experimento.

Casos clínicos: Deve-se evitar o uso de iniciais, nome e número de registro de pacientes. O uso de qualquer designação em tabelas, figuras ou fotografias, que identifiquem o indivíduo, não é permitido, a não ser que o paciente ou responsável expresse seu consentimento por escrito (em modelo anexado). O Editor Científico e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou que, ao seu julgamento, os métodos empregados não foram apropriados para o uso de humanos ou de animais nos trabalhos submetidos a este periódico.

- Registro de ensaios clínicos: A Revista de Odontologia da UNESP apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *International Committee of Medical Journal of Editors* (ICMJE). Sendo assim, são aceitos, para publicação, somente os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaio Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE, cujos endereços estão disponíveis no *site* do ICMJE. Além disso, os artigos originais com resultados de ensaios clínicos aleatorizados devem ser preparados de acordo com a declaração CONSORT (disponível em <http://www.consort-statement.org>). O número de identificação deve ser registrado no final do resumo.

No material ilustrativo, o paciente não deve ser identificado, não devendo aparecer nomes ou iniciais. Enviar cópia da autorização do paciente/responsável para publicação. Casos omissos nestas normas são resolvidos pelo Editor Científico e pela Comissão Editorial.

3. APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

ARTIGOS ORIGINAIS

Os artigos originais devem apresentar:

- **Resumo/Abstract:** estruturado em seções: introdução, objetivo, material e método, resultado e conclusão.
- **Introdução:** explicar precisamente o problema, utilizando literatura pertinente, identificando alguma lacuna que justifique a proposição do estudo. No final da introdução, estabelecer a hipótese a ser avaliada.
- **Material e método:** apresentar com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações e possibilitar sua reprodução. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes, depois da primeira citação dos produtos, instrumentos, reagentes ou equipamentos. Métodos já publicados devem ser referenciados, exceto se modificações tiverem sido feitas. No final do capítulo, descrever os métodos estatísticos utilizados.
- **Resultado:** os resultados devem ser apresentados seguindo a sequência do Material e método, com tabelas, ilustrações, etc. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e de ilustrações possível.
- **Discussão:** discutir os resultados em relação à hipótese testada e à literatura (concordando ou discordando de outros estudos, explicando os resultados diferentes). Destacar os achados do estudo e não repetir dados ou informações citados na introdução ou nos resultados. Relatar as limitações do estudo e sugerir estudos futuros.
- **Conclusão:** as conclusões devem ser coerentes com os objetivos, extraídas do estudo, não repetindo simplesmente os resultados.
- **Agradecimentos:** agradeça às pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo.
- **Auxílios financeiros:** especificar auxílios financeiros, citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.

REVISÃO DE LITERATURA SISTEMÁTICA

A Revista de Odontologia da UNESP só aceita **revisão de literatura sistemática**, com ou sem meta-análise, no formato e estilo Cochrane quando aplicável. Para maiores informações, consultar www.cochrane.org. As revisões de literatura devem contemplar assuntos atuais e de relevância para a área. Existem, na literatura, diversos exemplos deste tipo de revisão.

- **Resumo/Abstract:** estruturado em seções: introdução, objetivo, material e método, resultado e conclusão.

RELATO DE CASOS CLÍNICOS

- **Resumo/Abstract:** estruturado em seções: introdução, objetivo e conclusão.
- **Introdução:** deve conter uma explicação resumida do problema, citando somente referências relevantes e a proposição.
- **Descrição do caso clínico:** relatar o caso, destacando o problema, os tratamentos disponíveis e o tratamento selecionado. Descrever detalhadamente o tratamento, o

• **Discussão:** comentar as vantagens e desvantagens do tratamento, etc. Se o texto ficar repetitivo, omitir a discussão.

Para unidades de medida, devem ser utilizadas as unidades legais do Sistema Internacional de Medidas.

Nome de medicamentos e de materiais registrados, bem como produtos comerciais, devem aparecer entre parênteses, após a citação do material, e somente uma vez (na primeira).

E-mail: adriana@foar.unesp.br, dirstbd@foar.unesp.br,
revodontolunesp@yahoo.com.br, revodontolunesp@gmail.com.

Encaminho(amos) o artigo intitulado _____
de autoria de _____ para
análise e publicação na Revista de Odontologia da UNESP. Por meio deste documento,
transfiro(imos), para a Revista de Odontologia da UNESP, os direitos autorais a ele
referentes, que se tornarão de sua exclusiva propriedade, sendo vedada qualquer
reprodução total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação impressa,
sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e obtida, por escrito, junto à
Comissão Editorial da Revista.

Certifico(amos) que o manuscrito é um trabalho de pesquisa original, e que seu
conteúdo não está sendo considerado para publicação em outras revistas, seja no
formato impresso ou eletrônico, reservando-se seus direitos autorais para a referida
revista. A versão final do trabalho foi lida e aprovada por todos os autores.
Certifico(amos) que participei(amos) suficientemente do trabalho para tornar pública
minha(nossa) responsabilidade pelo seu conteúdo.

Declaro(amos) não possuir conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade
do trabalho científico.

Datar e assinar

____/____/____

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores do artigo intituladodeclaram
não possuir conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho
científico.

Datar e assinar

____/____/____

Observações:

- Os coautores, juntamente com os autores principais, devem assinar a declaração de
responsabilidade acima, configurando, também, a mesma concordância dos autores do
texto enviado sobre sua publicação, se aceito pela REVISTA DE ODONTOLOGIA DA
UNESP.