

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS E
PLANTAS BRASILEIRAS CONTRA *Enterococcus faecalis*.**

ADRIANA LIGIA DE CASTILHO

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS
DE PLANTAS BRASILEIRAS CONTRA *Enterococcus faecalis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ADRIANA LIGIA DE CASTILHO

São Paulo

2009

Castilho, Adriana Lúgia de
Avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas brasileiras contra *Enterococcus faecalis* / Adriana Lúgia de Castilho – São Paulo, 2009.
150 f.:il. Color

Dissertação (mestrado) – Apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2009.
Área de Concentração: Diagnóstico bucal e semiologia
“Orientação: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini”

1. *Enterococcus faecalis*. 2. Plantas brasileiras. 3. Antimicrobianos. 4. Infecções gerais e bucais. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Castilho AL. Avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas brasileiras contra *Enterococcus faecalis*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade Paulista – UNIP, 2009.

São Paulo, / /2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pelos momentos que me envolveu com Vossa presença e espírito. Pelos Vossos ensinamentos feitos através da Palavra e através de Vossos atos, muitos dos quais verdadeiros obstáculos e sofrimentos, que à primeira vista me soaram intransponíveis, mas que quando passei por eles, edificaram meu caráter e me ensinaram a ser uma pessoa mais digna de Vós. Tenho tanto a Vos agradecer que estas simples palavras seriam irrisórias frente a Vossos grandes feitos. Mas sei que hoje é dia de festa, porque alcancei, mediante Vossa ajuda e suporte dos que eu amo, mais uma vitória. Sou-Vos eternamente grata! Louvo para todo Universo a Vossa presença. E, em especial hoje, entrelaço as minhas mãos em Vossa homenagem e peço que continues caminhando comigo por toda minha vida.

Ao meu amado esposo Nelson, por sua compreensão, carinho e incansável apoio ao longo do período da elaboração deste trabalho. Pelo amor, respeito e admiração. Pela superação e demonstração de força. Sem você, meu amor, de nada valeria à pena...Meu amor por ti, querido, é minha essência.

Aos meus pais. De vocês recebi o dom mais precioso: a vida. Porém, não se contentando em me presentear apenas com ela; revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Abriram as portas do meu futuro iluminando-o com a luz mais brilhante: a busca pelo conhecimento. A quem muito amo, dedico mais esta vitória.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr^a. Ivana Barbosa Suffredini, por sua orientação, atenção, dedicação, carinho, paciência, sabedoria e amizade. Obrigada, pelo exemplo de destreza e capacidade de ensinar. Tenho a certeza de que aprendi a fazer ciência, pois verdadeiramente seus ensinamentos me guiaram pelo caminho a alcançar o estado da arte. No coração, levarei a gratidão, o respeito e a admiração.

À Prof^a. Dr^a. Cintia Helena Coury Saraceni, pela amizade verdadeira, pura e abençoada. Obrigada, por ser o “fogo” e a “água” nos momentos de felicidade e necessidade.

À Amiga e companheira de trabalho Juliana Paola Correa da Silva, pelas horas debruçadas sobre a bancada, pelo companheirismo, suores de sacrifício, risos e lágrimas.

À Amiga e parceira Ingrid Victorino Espósito, por estar de mãos dadas nesta jornada. Fica a certeza de uma grande e eterna amizade. Levarei comigo cada momento que passamos juntas por esta caminhada.

À grande amiga Prof^a. Maria Cristina Duarte Ferreira, por estar ao meu lado a mais de 10 anos e por me ensinar a respeitar o ser humano como ele é aceitando todas as limitações, principalmente as minhas.

À Universidade Paulista – UNIP e ao Laboratório de Extração, por terem sido minha segunda casa e sediado o universo de conhecimentos.

Aos amigos e professores do Laboratório de Extração Profa Dr^a. Ingrid Elida Collantes Diaz, Prof. Dr. Mateus Luis Barradas Paciência, Sergio Alexandre Frana e Joana Mattos Ozi.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Extração da UNIP, Karina Emiko Yamamura, Marlene Mori Nakandakari, Anderson da Cruz Silva, Maria de Fátima Henrique Salgado Pelosini e Ana Paula Kalaf.

Aos professores do Programa de Pós-graduação da Universidade Paulista – UNIP por terem sido verdadeiros Mestres. Obrigada pelos ensinamentos, pela segurança, pelo amparo nos instantes difíceis, nos momentos de dúvida, suscitando em mim a maturidade de uma profissional.

À Prof^a. Dr^a. Marina Ancona Lopez Soligo pela amizade, respeito e confiança.

Aos colegas do curso, pela amizade. E agora, que mais uma etapa está acabando, só nos resta agradecer ao destino por ter nos aproximado e ficar com a certeza de que não é o fim, mas sim o início de uma grande saudade.

Aos funcionários do Laboratório de Extração da UNIP, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Élcio Magdalena Giovani, pela parceria e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação da Universidade Paulista-UNIP pela cumplicidade.

À CAPES/PROSUP, pela bolsa concedida e pela confiança.

“Oh! Imensa é a graça poderosa que reside nas ervas e em suas raras quantidades, porque na terra não existe nada tão vil que não preste à terra algum benefício especial...Dentro do terno cálice da débil flor residem o veneno e o poder medicinal...”

(Cena III, Ato II Romeu e Julieta – William
Shakespeare, 1564–1616)

RESUMO

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) é uma bactéria de profundo interesse para a área da saúde, uma vez que está envolvida em diversas patologias, como as associadas ao trato urinário, infecções oportunistas em centros hospitalares de tratamento intensivo, em doenças orais, também como bactérias oportunistas, como cárie, doenças periodontais e endodônticas. A eliminação e o controle de infecções causadas por este micro-organismo é de extrema importância. Na Odontologia, em especial, a utilização de agentes químicos tradicionais, como clorexidina e hipoclorito de sódio, usados como substâncias padrão neste trabalho, apresentam desvantagens, tornando importante a busca por substâncias coadjuvantes. O Brasil é o país que detém 20% da biodiversidade mundial. Tanta riqueza em espécies proporciona um elevado potencial de se encontrar novas moléculas potencialmente bioativas. Baseado nesta possibilidade, a Universidade Paulista implantou, há mais de dez anos, um programa de bioprospecção de novos agentes anti-infecciosos e antitumorais. Dentro deste programa, seus pesquisadores sistematicamente coletam plantas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica para serem estudadas quanto às suas propriedades farmacológicas e fitoquímicas. Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de se identificar extratos vegetais ativos contra *E. faecalis*. Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa foram feitos com 2200 extratos vegetais, em modelo de microdiluição em caldo, no qual os extratos foram avaliados na concentração de 100 µg/mL e suspensão bacteriana de 1×10^2 UFC/mL. Destes extratos, 25 apresentaram atividade contra *E. faecalis* e foram testados em um modelo de disco difusão em ágar (DD), na concentração de 200 mg/mL e suspensão bacteriana de 0,5 McFarland. Além disso, foram testados no modelo de microdiluição em caldo (MDC), em diferentes concentrações bacterianas, de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 e 1×10^2 UFC/mL. No modelo de microdiluição em caldo (MDC), foram adicionados 10 µL de cada uma das soluções de extratos ou substâncias – padrão a 190 µL de suspensão bacteriana. No modelo de DD, verificou-se que todos os extratos e soluções padrão inibiram, em algum grau, o crescimento bacteriano. O modelo da MDC permitiu o estabelecimento da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para os extratos ativos. Três extratos, pertencentes às famílias Rubiaceae, Convolvulaceae e Clusiaceae, apresentaram atividade bactericida em concentrações ≤ 300 µg/mL. Com estes resultados, somados à importância clínica de *E. faecalis*, torna-se evidente a importância de se buscar novos produtos naturais antimicrobianos derivados de plantas Amazônicas.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, antimicrobianos, infecções bucais, extratos vegetais, Floresta Amazônica.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) is a bacteria of important interest in human health, once it is involved in innumerable pathologies, as those associated to the urinary system, as an opportunistic micro-organism responsible to systemic infections in intensive care patients, as well as opportunistic in oral diseases, such as cavities, periodontologic and endodontic conditions. The elimination and control of de infections caused by this micro-organism is of extreme importance. In Odontology, especially, the use of traditional substances such as chlorhexidine and sodium hypochloride, both used as standard drugs in the current study, show strong disadvantages, which culminate in the extreme need for new drugs to be introduced in therapy. Brazilian biodiversity is the hugest in the world, and gather 20% of the world's biodiversity.. such species richness represents an elevated potential in finding new antibiotics of natural sources. Based upon those possibilities, Universidade Paulista implemented, 10 years ago, a bioprospecting program set up to finding new anti-infectious and antitumor compounds. In this program, researchers systematically collect plants from the Amazon Rain Forest and from Mata Atlântica to be processed and studied in relation to their pharmacological and phytochemical properties. Considering the present context, this work was carried out with the aim of identifying crude plant extracts active against *E. faecalis*. Previous studies were primarily done with more than 2,000 extracts, diluted at 100 µg/mL, in the microdilution caldo assay (MBA), using bacteria concentration of 1×10^2 CFU/mL. Results showed that 25 out of 2,000 extracts showed activity against *E. faecalis*. Thus, these extracts were tested in the disk diffusion method (DD), in the concentration of 200 mg/mL and bacterial suspension prepared at 0,5 McFarland. More over, the same extracts were tested in the MBA using different extract concentrations and different bacteria concentrations. In the MBA, ten µL of each sample were added to 190 µL of bacteria suspension and turbidity/clearness was evaluated to each sample. In the DD, it was verified that all the 25 extracts showed some degree of bacterial growth inhibition. MBA permitted to establish the minimal inhibitory concentrations and mínima bactericidal concentrations for the 25 plant extracts. Three extracts, obtained from plants belonging to the Rubiaceae, Convolvulaceae and Clusiaceae families showed bactericide activity in concentrations ≤ 300 µg/mL, and may be a rich source of new antibacterial molecules. The clinical importance of *E. faecalis* and the search for new antibacterial molecules is highlighted by all the possibilities the richest biodiversity of the world offers to science..

Keywords: *Enterococcus faecalis*, antibacterial, oral infections, plant extracts, Amazon Rain Forest.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Cultura da Cepa padrão <i>Enterococcus faecalis</i>	22
FIGURA 2 – Lesão de cárie.....	25
FIGURA 3 – Doença periodontal crônica, cálculos supra e subgingivais.....	26
FIGURA 4 – Infecções e vias de contaminação da polpa dental.....	27
FIGURA 5 - Fórmula estrutural da clorexidina.....	35
FIGURA 6 – Preparo biomecânico dos canais radiculares.....	38
FIGURA 7 – Barco da UNIP.....	56
FIGURA 8 – Órgãos vegetais no saco de algodão.....	57
FIGURA 9 – Órgãos vegetais moídos.....	58
FIGURA 10 – A – Identificação da família e gênero, B – Esxicata.....	58
FIGURA 11 - A, B – Percoladores e extratos.....	59
FIGURA 12 – Rotoevaporador.....	60
FIGURA 13 – Liofilizador e extrato aquoso.....	60
FIGURA 14 - A – Extrato orgânico, B – Extrato aquoso.....	61
FIGURA 15 - Balança analítica e pesagem dos extratos vegetais.....	62
FIGURA 16 – Câmara fria.....	62
FIGURA 17 – Vórtex Thermolyne®	63
FIGURA 18 - A - hipoclorito de sódio manipulado 10%, B - hipoclorito de sódio comercializada 1%, C - solução de clorexidina comercializada 2%, D - solução de clorexidina manipulado 20%.....	64
FIGURA 19 – Meio Müller Hinton Ágar e Meio Müller Hinton Caldo.....	66
FIGURA 20 – Placas de Petri com meio Müller Hinton Ágar.....	66
FIGURA 21 –Autoclave.....	68
FIGURA 22 – Cepa <i>Enterococcus faecalis</i>	69
FIGURA 23 – A – Envelope <i>Enterococcus faecalis</i> , B – Reativação na placa Müller Hinton Ágar.....	69
FIGURA 24 – Colônia de <i>Enterococcus faecalis</i> na 3ª passagem.....	71
FIGURA 25 – Tubos de ensaio de suspensão bacteriana.....	72
FIGURA 26 – Padronização da suspensão bacteriana no turbidímetro.....	73
FIGURA 27 - A – Inoculação <i>Enterococcus faecalis</i> , B – Ensaio no disco difusão.....	74

FIGURA 28 - A – halo de inibição do extrato 352, B – halo de inibição do extrato 841	74
FIGURA 29 - A, B – Resultados no modelo disco difusão em ágar de dimetil sulfóxido 50% e 100% contra <i>Enterococcus faecalis</i>	75
FIGURA 30 - A,B,C,D – Resultados no modelo disco difusão em ágar de clorexidina (manipulada) 0,12%, 1% e 2%, 20% contra <i>Enterococcus faecalis</i>	75
FIGURA 31 – A, B – Resultados no modelo disco difusão em ágar de clorexidina (comercializada) 0,12%, 1% e 2% contra <i>Enterococcus faecalis</i>	76
FIGURA 32 - Resultados no modelo disco difusão em ágar de hipoclorito de sódio (manipulado) 0,5% e 1% (comercializada) contra <i>Enterococcus faecalis</i>	76
FIGURA 33 - Leitura dos halos	77
FIGURA 34 - Esquema do método de diluição em série	78
FIGURA 35 – Material para ensaio de microdiluição em caldo no fluxo laminar	79
FIGURA 36 – Ensaio de microdiluição em caldo	80
FIGURA 37 - A, B, C – Leitura visual dos poços	81
FIGURA 38- Subcultura em placa de Müller Hinton Ágar	81
FIGURA 39 – Partição Líquido-Líquido	83
FIGURA 40 – Frascos de criogenia com os 75 resíduos	83
FIGURA 41 – A,B,C,D – Ensaio de disco difusão em ágar dos 75 resíduos	84
FIGURA 42 – A,B,C,D – Ensaio de microdiluição em caldo dos 75 resíduos	85
FIGURA 43 – Subcultura em placa de Müller Hinton Ágar	86
FIGURA 44 – A,B – Cromatofolhas e resíduos	87
FIGURA 45 – A,B – Amostras nas cromatofolhas e sistema de solventes	87
FIGURA 46 – Imagem das manchas sob luz ultravioleta	88
FIGURA 47 – A – ácido sulfúrico 25% na cromatofolha, B – revelação em chapa de aquecimento	88

LISTA DE GRÁFICOS E QUADROS

GRÁFICO 1 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 55.....	96
GRÁFICO 2 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 321.....	96
GRÁFICO 3 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 352.....	96
GRÁFICO 4 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 429.....	97
GRÁFICO 5 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 841.....	97
GRÁFICO 6 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1247.....	97
GRÁFICO 7 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1257.....	98
GRÁFICO 8 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1259.....	98
GRÁFICO 9 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1298.....	98
GRÁFICO 10 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1373.....	99
GRÁFICO 11 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1389.....	99
GRÁFICO 12 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1395.....	99
GRÁFICO 13 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1461.....	100
GRÁFICO 14 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1493.....	100
GRÁFICO 15 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1497.....	100
GRÁFICO 16 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1525.....	101
GRÁFICO 17 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1543.....	101
GRÁFICO 18 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1549.....	101
GRÁFICO 19 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1637.....	102
GRÁFICO 20 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1743.....	102
GRÁFICO 21 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1765.....	102
GRÁFICO 22 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1905.....	103
GRÁFICO 23 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1923.....	103
GRÁFICO 24 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1991.....	104
GRÁFICO 25 - Concentração Bactericida Mínima do extrato 1999.....	104
QUADRO 1 – Composição do Mueller Hinton Ágar.....	65
QUADRO 2 - Composição do Mueller Hinton Caldo.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais espécies identificadas nas infecções endodônticas.....	30
TABELA 2 – Micro-organismos presentes nas infecções	31
TABELA 3 – Soluções de hipoclorito de sódio	44
TABELA 4 – Resultados dos 25 extratos.....	91
TABELA 5 – Resultados dos 25 extratos.....	92
TABELA 6 – Resultados antimicrobianos.....	93
TABELA 7 – Resultados antimicrobianos.....	93
TABELA 8 – Resultados antimicrobianos.....	94
TABELA 9 – Resultados antimicrobianos.....	95
TABELA 10 – Resultados antimicrobianos dos resíduos.....	105
TABELA 11 - Resultados antimicrobianos dos resíduos.....	106
TABELA 12 - Resultados da cromatografia.....	107
TABELA 13 - Resultados cromatográficos ao reagente β -caroteno.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^a – abreviação referente ao gênero feminino

a.C – antes de Cristo

ATCC – American Type Culture Collection

AQ-aquoso

BuOH – n-butanol

CBM – Concentração bactericida mínima

CGen – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CIM – Concentração inibitória mínima

CHCL₃ - clorofórmio

CLS – Committe for Clinical Laboratory Standars

DDA – disco difusão em ágar

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al. – e colaboradores

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

MDC – microdiluição em caldo

MHA – Müller Hinton Ágar

MHC – Müller Hinton caldo

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standars

PCR – polimerase chain reaction

pH – potencial hidrogênico

RTC-PCR – Real time quantitative polymerase chain reaction

SF – Soro fisiológico

Smear layer – antigamente

UNIP – Universidade Paulista

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

µm – microgramas

°C – graus Celsius

® - marca registrada

g/mol – grama por mol

mL- mililitro

mg – miligramas

UFC/mL – unidade formadora de colônias por mililitro

mm – milímetros

µg/mL – microgramas por mililitros

≥ - maior ou igual

≤ - menor ou igual

< - menor

> - maior

= - igual

p - probabilidade

nm - nanômetro

log - logaritmo

µg - micrograma

+ - adição ou positivo

- - subtração ou negativo

H - hidrogênio

: - divisão

mg/mL – miligrama por mililitro

L - litro

g/L – grama por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.2 Doenças bacterianas causadas por <i>Enterococcus faecalis</i>	22
2.3 Etiopatogenia das infecções bucais.....	24
2.3.1 Cárie dental, infecções periodontais e infecções endodônticas.....	24
2.4 Soluções irrigadoras antimicrobianas utilizadas no tratamento da cárie, infecções periodontais e endodônticas.....	35
2.4.1 Digluconato de clorexidina 0,12% e 2%.....	35
2.4.2 Hipoclorito de sódio 1%.....	43
2.5 Plantas da Amazônia e Mata Atlântica com propriedades antimicrobianas.....	47
2.6 Ação antimicrobiana de plantas contra <i>Enterococcus faecalis</i>	50
3 PROPOSIÇÃO	55
3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivo específico.....	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Material.....	55
4.2 Métodos.....	56
4.2.1 Coleta de plantas.....	57
4.2.2 Preparação e Obtenção dos extratos vegetais.....	59
4.2.3 Pesagem dos extratos vegetais.....	61
4.2.4 Preparação das amostras de extratos vegetais e substâncias padrão.....	63
4.2.5 Meio de cultura.....	65
4.2.5.1 Müller Hinton Ágar (MHA).....	65
4.2.5.2 Müller Hinton Caldo (MHC).....	67

4.2.6 Cepa bacteriana.....	68
4.2.6.1 Coloração de gram.....	70
4.2.6.2 Teste da catalase.....	70
4.2.7 Preparo da cultura bacteriana fresca.....	71
4.2.8 Preparo da suspensão bacteriana para os ensaios antimicrobianos em disco difusão em ágar.....	72
4.2.8.1 Disco difusão em ágar - DDA.....	73
4.2.8.2 Delineamento experimental para o ensaio de disco difusão.....	77
4.2.9 Preparo da suspensão bacteriana para os ensaios antimicrobianos em microdiluição em caldo.....	77
4.2.9.1 Microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima - CBM.....	79
4.2.10 Partição Líquido-Líquido.....	82
4.2.11 Disco difusão em ágar feito com os resíduos.....	84
4.2.12 Microdiluição em caldo - MDC dos resíduos.....	85
4.2.13 Cromatografia.....	86
4.2.14 Teste de potencial atividade antioxidante.....	89
5 RESULTADOS.....	90
6 DISCUSSÃO.....	99
6.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	99
6.2 Ensaio do disco difusão em ágar.....	109
6.3 Ensaio da microdiluição em caldo.....	111
6.4 Análise comparativa inicial da atividade antimicrobiana feita com os dois modelos, disco difusão em ágar e microdiluição em caldo.....	117
6.5 Análise dos resíduos originados dos 25 extratos em ambos os modelos antimicrobianos adotados.....	118
6.6 Análise das substâncias padrão nos dois modelos biológicos selecionados.....	119
6.7 Análise da literatura dos compostos químicos e atividade biológica que ocorrem nas espécies selecionadas ou em alguma taxa superior.....	120
6.8 Análise da eficácia da partição líquido-líquido dos extratos e avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e frações.....	124

6.9 Importância da identificação de novos agentes antibacterianos a partir de plantas brasileiras.....	124
7 CONCLUSÃO.....	126
REFERÊNCIAS.....	127

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos, a busca científica do controle de diversas doenças é alvo nas diferentes áreas da saúde. Os estudos pormenorizados acerca das reações biológicas interligam a Odontologia, Medicina, Farmácia, Química, Botânica, Microbiologia e Patologia. O reconhecimento e identificação dos micro-organismos presentes nas patologias sistêmicas e bucais favorecem a adoção de medidas que visam controlar os mesmos.

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) é um dos principais patógenos nosocomiais, capaz de resistir a diversos agentes antimicrobianos e causar diversas doenças, pois colonizam o trato intestinal e genito-urinário, além de merecerem atenção por estarem relacionados às endocardites infecciosas e infecções em feridas cirúrgicas. Na cavidade bucal é possível encontrar *E. faecalis* em lesões de cárie, nas doenças periodontais e principalmente nas infecções endodônticas, cuja contaminação pulpar pode ocorrer via túbulos dentinários através das lesões de cárie e via doença periodontal. A capacidade de invadir túbulos dentinários, resistir a diversos antibióticos e soluções irrigadoras antimicrobianas e sobreviver na ausência de nutrientes traduzem o porquê dos estudos tentarem suprimir e sustentar o controle deste micro-organismo que contribui para o insucesso da terapia endodôntica.

O preparo químico e mecânico dos tratamentos propostos na lesão de cárie, infecções periodontais e endodônticas tem por objetivo diminuir a infecção e propiciar um ambiente favorável à eficácia do tratamento. A característica deste preparo está relacionada à tentativa de combater diversos micro-organismos, dentre os quais *E. faecalis*, bactéria que ganha uma alta virulência nas condições patológicas da doença endodôntica e que se torna o principal alvo de ataque medicamentoso no tratamento desta condição. Atualmente, o número de substâncias irrigadoras com propriedades antimicrobianas empregadas no tratamento periodontal, endodôntico e lesões de cárie é limitado em decorrência de diversos fatores, como toxicidade, pH, sabor e odor desagradáveis e a incapacidade de degradar matéria orgânica e *smear layer*. As substâncias mais indicadas e utilizadas são digluconato de clorexidina 0,12% (periodontia) e 2% (dentística e endodontia) e hipoclorito de sódio 1% (endodontia). Uma vez confirmados os fatores

indesejáveis destas soluções, torna-se necessária a introdução de novas ferramentas para auxiliar o Cirurgião Dentista no combate a *E. faecalis*.

O uso de plantas medicinais é descrito desde Hipócrates (460 a.C.). As propriedades terapêuticas das plantas já eram conhecidas pelos povos primitivos da China, Índia e Egito. Atualmente, o uso de plantas medicinais continua a ser bastante difundido, em particular, em regiões onde o acesso a medicamentos industrializados é limitado ou inexistente, como alguns países da África, América Latina e Ásia. Estudos sistemáticos com extratos vegetais e animais têm demonstrado que é possível se encontrar compostos com potencial de serem transformados em medicamentos, como alguns quimioterápicos antitumorais (paclitaxel, vincristina, vimblastina, podofilotoxina) e antibacterianos (penicilina, eritromicina) (YOUNES *et al.* 2007; SUFFREDINI *et al.* 2002a; SUFFREDINI *et al.* 2002b).

O Brasil é o país com maior biodiversidade do planeta e detém cerca de 20% de todas as espécies vegetais ou animais do mundo. A Mata Atlântica contém aproximadamente 35% de todas as Angiospermas do mundo e mais de 8% das Pteridofitas (Dossiê Mata Atlântica, 2001). Além disso, somente uma pequena quantidade de plantas e/ou animais foram estudados do ponto de vista farmacológico ou fitoquímico, tornando imediata a necessidade de se implementar estudos em grande escala em determinadas regiões, como Amazônia e Mata Atlântica, ampliando o conhecimento da potencialidade química e farmacológica das plantas presentes nas florestas brasileiras.

Diante do exposto, a Universidade Paulista estabeleceu, em 1996, um programa de bioprospecção em larga escala que visa, dentre outras coisas, estabelecer uma extratoteca representativa da flora brasileira, triar os extratos em modelos biológicos *in vitro* e identificar os compostos ativos presentes nos extratos. Este programa possui autorização de coleta de material vegetal expedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, e possui autorização para acessar os recursos genéticos, expedida pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, CGen. Neste programa, os extratos já foram testados contra células de tumores humanos de mama, próstata, cólon, pulmão, sistema nervoso central, cabeça-e-pescoço e leucemia, e contra diversos micro-organismos, como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* (*C. albicans*),

Streptococcus mutans (*S. mutans*), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) e *Enterococcus faecalis*. Os resultados da triagem realizada com este último micro-organismo, de nítida importância em Odontologia, geraram o presente trabalho. (SUFFREDINI et al. 2004; SUFFREDINI et al. 2006a; SUFFREDINI et al. 2006b) .

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Enterococcus faecalis*

O gênero *Enterococcus* é representado por várias espécies, sendo duas principais a causarem a maioria das infecções: *E. faecalis*, mais frequente nas infecções, representando 90% dos casos, e *E. faecium*, que apresenta uma incidência de 5% a 10%. São cocos cujo tamanho varia de 0,6 a 2,5 µm, dispostos em curtas cadeias geralmente em pares, são móveis, embora tenham poucos flagelos, não são catalase responsivos, são saprófitas, crescem à temperatura de 10°C a 45°C, pH 9,6, crescem em soluções salinas e em detergentes, são anaeróbias Gram-positivas facultativas e podem estar associados a casos de indivíduos hospitalizados por longos períodos, especialmente aqueles imunossuprimidos (MURRAY 2000; LEME, FERREIRA 2001; MORNER *et al.* 2005; ZARRILI *et al.* 2005).

E. faecalis (Figura 1) é considerado um dos principais patógenos nosocomiais e, dependendo da cepa, pode resistir aos diversos antimicrobianos existentes. Pode ser encontrado em condições patológicas nos tratos intestinal e genito-urinário, vesícula biliar e na cavidade bucal. A ocorrência sistêmica destes patógenos pode fornecer informações importantes que alertam a possibilidade de endocardite infecciosa e infecções em feridas cirúrgicas (HORNER *et al.* 2005).

A figura 1 apresenta uma imagem das colônias obtidas da cepa padrão de *Enterococcus faecalis* código 29212, originada da American Type Culture Collection - ATCC®, Estados Unidos. A bactéria foi estriada em placa de Petri em meio Müller Hinton ágar, 24 horas de crescimento a 37°C.



Figura 1. Meio de cultura da cepa padrão *Enterococcus faecalis* código 29212, originada da American Type Culture Collection - ATCC®, Estados Unidos, estriada em placa de Petri, meio Müller Hinton ágar, após 24 horas de crescimento a 37°C.

Algumas cepas de *E. faecalis* podem apresentar resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, como ampicilina e penicilina (ASLANGUL *et al.* 2005), aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) (KONEMAN *et al.* 2001, ZARRILLI *et al.* 2005) e glicopeptídeos (vancomicina) (CORVALIN *et al.* 2006).

2.2 Doenças bacterianas causadas por *Enterococcus faecalis*

E. faecalis está associada às infecções que acometem os tratos intestinal e genito-urinário, vesícula biliar, bacteremia, endocardite infecciosa (Pasticci *et al.* 2008) e doenças que ocorrem na cavidade bucal (SOUTO *et al.* 2006; PARADELLA, KOGA-ITO, JORGE 2007).

Gould *et al.* (2004) concluíram em seus estudos que as infecções associadas a *E. faecalis* no trato urinário são comumente encontradas nos homens, principalmente aqueles internados em hospitais a mais de 30 dias.

Sandri (2004) relata que o trato intestinal é a segunda região acometida por infecções causadas pelo micro-organismo. A endocardite infecciosa e as bacteremias são importantes patologias encontradas interligadas a *E. faecalis*, assim

como as infecções em feridas cirúrgicas (HORNER *et al.* 2005, DESHPANDE *et al.* 2007).

Uip *et al.* (1996) avaliaram as ocorrências e os agentes etiológicos em 100 pacientes submetidos a transplante cardíaco, cuja cardiopatia prévia motivou o transplante. A profilaxia antibiótica foi realizada em todos os casos, sendo que 73 pacientes receberam cefoxitina e oxacilina, 27 pacientes receberam, cefuroxima, 66 pacientes foram submetidos a imunossupressores do tipo corticosteróides, azatioprina e ciclosporina e os 34 restantes receberam adição da globulina antilinfocítica. Mesmo seguindo um protocolo profilático e terapêutico rigoroso, foram constatadas diversas infecções pós-transplante, dentre as quais, a endocardite infecciosa, que foi observada em cinco pacientes. Dos cinco pacientes, três foram a óbito, e destes, dois apresentaram *E. faecalis* relacionada à endocardite.

Ruiz-Junior, Schirmbeck, Figueiredo (2000) analisaram os agentes etiológicos da endocardite infecciosa presente em 168 pacientes portadores de diversas doenças por um período de seis anos e verificaram que o *Enterococcus faecalis* estava presente em oito pacientes (4,7% dos casos).

Furtado *et al.* (2005) realizaram um estudo epidemiológico durante o período de 2000 a 2002, no Hospital Universitário da Escola Paulista de Medicina de São Paulo, com 660 indivíduos. Foram utilizadas 240 culturas positivas de *E. faecalis* resistente à vancomicina, e verificaram um aumento progressivo da resistência com o passar dos anos. Além disso, observaram que os pacientes que apresentavam infecção urinária (36,6%), infecção na corrente sanguínea (20,8%), infecção na ferida cirúrgica (7,9%) e contaminação na ponta de catéter (7,9%) eram os que apresentavam maior sensibilidade à vancomicina, respectivamente. Sendo assim, os autores concluíram que as infecções por *E. faecalis* são mais incidentes em unidades críticas, como unidades de terapia intensiva – UTI, seguido pelo pronto socorro.

Horner *et al.* (2005) determinaram o perfil de sensibilidade do gênero *Enterococcus* em pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, por um período de um ano. Verificaram que, das 233 cepas de *Enterococcus* isoladas, 32 foram isoladas de indivíduos presentes nos ambulatórios e 201 de pacientes internados, dos quais 12 se encontravam no bloco cirúrgico, 14 na UTI pediátrica, sete na pediatria, 22 na UTI adulto, 137 na clínica médica e 9 na obstetrícia. Das cepas de *Enterococcus* isoladas, 198 eram *E. faecalis* e o restante

correspondiam às demais espécies. Os resultados demonstraram a necessidade de se reduzir a transmissão de paciente para paciente, bem como alertaram veementemente sobre a importância de controlar as infecções advindas de *E. faecalis*.

2.3 Etiopatogenia das infecções bucais

2.3.1 Cárie dental, infecções periodontais e infecções endodônticas

E. faecalis é um indicador biológico extensivamente avaliado na endodontia, devido à sua prevalência elevada nos casos de insucesso no tratamento endodôntico (SUNDQVIST, *et al.* 2003; KRISTICH *et al.* 2004; DUGGAN, SEDGLEY 2007). Entretanto, também estão associados às lesões de cárie e infecções periodontais como bactérias oportunistas (SOUTO *et al.* 2006).

A cárie é uma doença infecciosa crônica de etiologia multifatorial, cujos princípios estão na formação do biofilme dental aliado as condições predisponentes ao desenvolvimento, como dieta, tempo sem profilaxia, condições fisiopatológicas e imunológicas do hospedeiro, micro-organismos presentes, fermentação de açúcares e liberação de ácidos que desmineralizam a estrutura dentária (BARBOSA, MEDEIROS 2002). Outras bactérias menos frequentes podem estar presentes no biofilme dental em condições patológicas que permitem o desenvolvimento da doença cárie (Figura 2), como *Enterococcus faecalis*, que fazem parte do complexo bacteriano bucal (PARADELLA, KOGA-ITO, JORGE 2007; SOBRAL *et al.* 2007).



Figura 2. Lesão de cárie.

A lesão de cárie é uma importante via de acesso para micro-organismos atingirem a polpa dentária. Quando este micro-organismo é *E. faecalis*, a polpa é afetada por um processo inflamatório e infeccioso, desencadeado em função da capacidade de invasão e aderência aos túbulos dentinários que *E. faecalis* possui. Por isso, Souto *et al.* (2007) realizaram um estudo histoquímico sobre a presença de bactérias nas lesões cariosas e periapicais. Selecionaram 40 casos *in vivo* de lesões periapicais diagnosticadas por exame histopatológico após a exodontia dos elementos dentários. Dos 40 dentes estudados, 13 apresentaram cárie. Cada dente cariado foi preparado para avaliação histopatológica e histoquímica a fim de verificar a presença de bactérias em cada caso. Os resultados revelaram a predominância de cocos em relação aos bacilos no interior dos túbulos dentinários. Observaram também que, em todos os dentes que apresentavam lesão de cárie, havia infiltração leve de tecido conjuntivo pulpar e presença de bactérias Gram-positivas. Sendo assim, os autores constataram que o processo carioso, a inflamação e infecção pulpar estão correlacionadas de maneira interdependentes.

Diversos estudos (PINHEIRO *et al.* 2003; JOHNSON, FLANNAGAN, SEDGLEY 2006; SEDGLEY, BUCK, APPELBE 2006) demonstram a inter-relação nítida de *E. faecalis*, as lesões de cárie e infecções periodontais do tipo gengivite e periodontite, assim como a associação de infecções endodônticas e periodontite apical crônica (KAYAOGLU, ORSTAVIK 2004; GOMES *et al.* 2004; REYNAUD *et al.* 2007).

Salah *et al.* (2008) realizaram um estudo com a população jordaniana a fim de investigar os fatores de virulência e a susceptibilidade antimicrobiana associadas às infecções bucais como cárie, gengivite, periodontite e infecção endodôntica. A amostra foi constituída de 159 indivíduos com idade entre 14 e 75 anos, cujas salivas foram analisadas quanto à ocorrência de *E. faecalis*. Estes dados foram comparados às informações referentes à ocorrência das infecções bucais em pelo menos um elemento dental. De toda a amostra analisada, 50 indivíduos faziam parte do controle negativo, sem infecção bucal. Os resultados demonstraram associação das infecções bucais e *E. faecalis*, quando comparados ao grupo controle.

Segundo Rams *et al* (1992) *E. faecalis* está relacionada a periodontite crônica (Figura 3). Diversos estudos com objetivo de detectar os micro-organismos presentes nas infecções endodônticas fazem referência a *E. faecalis* e às bactérias características das doenças periodontais como *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prophyromonas endodontalis* (*P. endodontalis*), *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) e *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), fato que reforça a associação das infecções periodontais às doenças endodônticas (HASHIMURA, SATO, HOSHINO 2001; RÔÇAS, VALOIS, SIQUEIRA-JUNIOR 2001; ROLPH *et al.* 2001).



Figura 3. Doença periodontal crônica, cálculos supra e subgengivais.

A polpa dental é asséptica e protegida pela dentina, esmalte e cimento. Quando algumas destas barreiras de proteção são rompidas, uma infecção pulpar ou endodôntica será desencadeada. Há duas vias de acesso para os micro-organismos atingirem a polpa: via túbulos dentinários e via periodontal. O acesso aos túbulos dentinários ocorre quando há uma lesão de cárie profunda, um trauma dental, fraturas próximas à polpa e preparos protéticos invasivos que exponham dentina e causem injúrias à polpa. Por via periodontal, o elemento dental encontra-se hígido, entretanto a presença de doença periodontal e conseqüentemente uma bolsa periodontal favorece o acesso dos micro-organismos à polpa por via apical e/ou canais radiculares acessórios (Figura 4). Geralmente é uma infecção endoperio caracterizada pela contaminação pulpar por bactérias via canais acessórios e através da irrigação sanguínea do periodonto (GAETTI-JARDIM-JUNIOR *et al.* 2001).

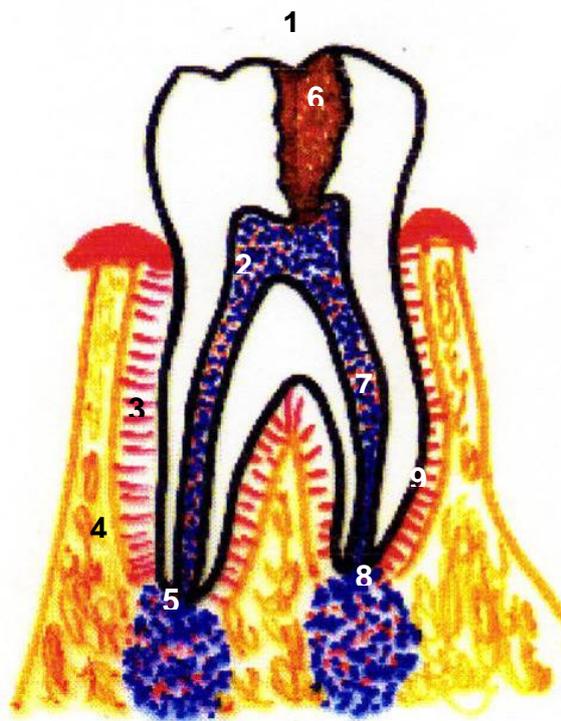


Figura 4. Infecções e vias de contaminação da polpa dental. **Legenda:** 1. Lesão de cárie, 2. Polpa dental, 3. Ligamento periodontal, 4. Osso alveolar, 5. Lesão periapical, 6. Contaminação por lesão de cárie, 7. Contaminação pulpar, 8. Contaminação periodontal formando lesão perirradicular, 9. Contaminação periodontal invadindo a polpa.

Segundo Sundqvist (1994), a via de acesso é fundamental para indicar quais os possíveis micro-organismos envolvidos nas infecções endodônticas, bem como a profundidade da lesão de cárie, a gravidade da doença periodontal e presença ou ausência de oxigênio. O predomínio de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, leveduras e fungos está associado às condições presentes em cada via de acesso

Em 1894, Miller publicou um artigo relatando pela primeira vez a presença de bactérias do grupo dos *streptococos* e *micrococcos* na polpa dental necrótica, associando as lesões perirradiculares às alterações pulpares. As formas microbianas encontradas por este autor foram confirmadas e complementadas pelos experimentos de Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965), que evidenciaram a importância do conhecimento da flora microbiana e seus resíduos tóxicos essenciais nas infecções endodônticas pulpares e perirradiculares, através de estudos em ratos. As polpas dos molares de ambos os grupos foram expostas, entretanto nos ratos convencionais ocorreu infecção endodôntica, inflamação crônica, necrose e lesão periradicular. Porém, nos animais *germ free*, a polpa manteve-se vital por mais tempo, até mesmo apresentando reparação de dentina na área exposta. Os autores concluíram que a presença de micro-organismos é fundamental para o surgimento de infecção endodôntica.

A partir da década de 70, iniciou-se uma gama de estudos envolvendo a patogênese endodôntica, principalmente pelo aperfeiçoamento das técnicas microbiológicas, inclusive no isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias estritas.

Assim que a espécie microbiana e seus catabólitos entram em contato com a polpa dental, inicia-se o processo inflamatório que eleva a pressão no interior do canal radicular, desequilibrando o suprimento sanguíneo, o que conseqüentemente leva à necrose pulpar e periradicular, resultando na infecção endodôntica (HIZATUGU *et al.* 2002).

Mesmo que *E. faecalis* ocorra em cáries e em doenças periodontais, seu significado é mais intenso e representativo quando presente na doença endodôntica. A literatura demonstra este fato através dos inúmeros trabalhos feitos nesta área.

Pinheiro *et al.* (2003) analisaram a microbiota e a susceptibilidade a diferentes antibióticos em 30 pacientes, cujos dentes foram obturados há mais de quatro anos e havia rarefação óssea periapical visualizada radiograficamente. Após a desobturação dos canais, coletou-se o material para isolar e identificar as espécies

microbianas. Os resultados revelaram que 58% de todas as espécies pertenciam ao grupo de anaeróbios facultativos e 42% anaeróbios obrigatórios. As espécies Gram-positivas contabilizaram 80% e os gêneros mais frequentes foram *Enterococcus* (36,7%), *Streptococcus* (30%), *Peptostreptococcus* (23,3%), *Actinomices* (13,3%) e *Prevotella* (10%). Todas as espécies apresentaram susceptibilidade aos antibióticos (benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulanato), verificada pelo sistema *E-test*. Contudo, 20% *Enterococcus faecalis* apresentaram-se resistentes a eritromicina e 60% a azitromicina. Assim, os autores concluíram que a microbiota presente nos casos de insucesso ao tratamento endodôntico é predominantemente constituída de anaeróbios facultativos e Gram-positivas.

A cavidade pulpar e suas ramificações, no caso da polpa necrótica com ou sem lesão periapical, tornam-se ambientes propícios para a invasão de micro-organismos da cavidade bucal. Nos casos de necrose pulpar, as substâncias residuais deste processo, associadas ao fluido tecidual e desintegração do tecido conjuntivo, fornecem nutrientes importantes gerando um verdadeiro ambiente ecológico para o desenvolvimento de diversos micro-organismos, segundo Siqueira-Junior *et al.* (2002).

Tais acontecimentos, agregados às diferentes condições clínicas, classificam as infecções endodônticas em primárias e secundárias. Os micro-organismos presentes na polpa necrótica levam à infecção primária e aqueles que alcançaram a polpa durante as sessões de tratamento endodôntico ou após a conclusão do tratamento identificam a secundária (MOLANDER *et al.* 1998; SIQUEIRA-JUNIOR *et al.* 2002; PINHEIRO *et al.* 2003).

A Tabela 1 apresenta as principais espécies bacterianas presentes nas infecções pulpares segundo Hizatugu *et al.* (2002).

Tabela 1. Principais espécies identificadas nas infecções endodônticas, segundo Hizatugu *et al.* (2002).

Espécies Anaeróbias estritas			
Cocos	Bacilos Gram-negativos	Cocos	Bacilos Gram-positivos
<i>Veillonella</i>	<i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Bacterioides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Campylobacter</i> <i>Selenomonas</i> <i>Treponema</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Eubacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Actinomyces</i>
Espécies Anaeróbias facultativas			
Cocos	Bacilos Gram-negativos	Cocos	Bacilos Gram-positivos
<i>Neisseria</i>	<i>Actinobacillus</i> <i>Haemophilus</i> <i>Eikenella</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Xantomonas</i> <i>Proteus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Gemella</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Propionibacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Actinomyces</i> <i>Bacillus</i> <i>Corynebacterium</i>
Espécies Aeróbias			
Cocos	Bacilos Gram-negativos	Cocos	Bacilos Gram-positivos
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Micrococcus</i>	

Lana *et al.* (2001) determinaram a presença de diversas espécies microbianas em 31 dentes unirradiculares. O primeiro passo foi realizado *in vivo*, cuja coleta das amostras ocorreu logo ao primeiro acesso à câmara pulpar através de cirurgiaarendodôntica. Seguiu-se o tratamento endodôntico mecânico e químico e colocação de hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Após sete dias, a medicação foi removida para a obtenção da segunda amostra. Antes da obturação do canal, nesta mesma sessão, foi coletada a terceira e última amostra para análise, logo após finalizar o preparo químico-mecânico. Os resultados evidenciaram o predomínio dos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* (88,9%) na primeira coleta, bactérias anaeróbias facultativas

(*Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Candida*) na segunda coleta e *Pseudomonas* e *Gemella* na terceira coleta, antes da obturação definitiva. Os autores concluíram que, na presença de necrose pulpar, há persistência de alguns micro-organismos, mesmo após a intervenção endodôntica, especialmente das bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas.

Gomes *et al.* (2004) coletaram amostras de 60 canais com infecção endodôntica, sendo 41 (34%) com polpa necrótica e 19 (25%) com falha no tratamento endodôntico e presença de lesão perirradicular. Nos 60 canais estudados, foram encontrados 32,6% de bactérias Gram-negativas e 67,4% de bactérias Gram-positivas, distribuídas diferentemente nos casos de infecção primária (polpa necrosada) e infecção secundária (insucesso do tratamento endodôntico). Os autores concluíram que os micro-organismos presentes nas infecções primárias são diferentes das secundárias.

Siqueira-Junior e Lopes (1999) classificaram os micro-organismos por gênero mais frequentes segundo a infecção endodôntica, sendo que a *Enterococcus faecalis* está presente nas infecções secundárias, descrito na Tabela 2, embora os mesmos não tenham especificado os micro-organismos.

Tabela 2. Micro-organismos por gênero presentes nas infecções primária, secundária e persistente segundo Siqueira-Junior e Lopes (1999).

Infecção endodôntica primária	Infecção endodôntica secundária	Infecção endodôntica persistente
<i>Fusobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Eubacterium</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Fungos</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Escherichia</i>	
<i>Propionibacterium</i>	<i>Fungos</i>	
<i>Porphyromonas</i>		
<i>Peptostreptococcus</i>		

Nos últimos anos, graças às técnicas moleculares de *polimerase chain reaction* – PCR, algumas bactérias difíceis de serem cultivadas em laboratório foram

detectadas e acrescentadas na lista de micro-organismos presente nas infecções endodônticas primárias, como *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Bacterioides forsythus* (*B. forsythus*), *Slackia exigua* (antes *Eubacterium exiguum*) (*S. exigua*), *Mogibacterium timidum* (antes *Eubacterium timidum*) (*M. timidum*) e *Eubacterium saphenum* (*E. saphenum*), segundo Jung *et al.* (2000), Siqueira-Junior *et al.* (2000), Hashimura *et al.* (2001), Gomes *et al.* (2006).

Peciulienė *et al.* (2000) realizaram um estudo em 25 dentes com indicação de retratamento e presença de lesão perirradicular comprovada radiograficamente, no objetivo de avaliar a presença de *Enterococcus faecalis*. Foram coletadas duas amostras de cada dente, sendo a primeira imediatamente após desobturação do canal logo que se teve acesso ao terço apical e a segunda ao final de todo preparo, ambos com auxílio de cones de papel absorvente estéreis. As culturas foram realizadas em placas e os micro-organismos isolados e identificados. *E. faecalis* esteve presente em 14 dentes na primeira coleta, sendo cinco em cultura pura (isolado) e nove associados a outros micro-organismos. Na segunda coleta, foram isoladas sete culturas sendo *E. faecalis* identificada em cinco. Os autores concluíram que a presença de *E. faecalis* está fortemente associada aos retratamentos endodônticos.

Love (2001) procurou compreender e explicar o possível mecanismo envolvido na sobrevivência de *E. faecalis* nos túbulos dentinários, mesmo após o tratamento endodôntico final. Foram desgastados 100 dentes humanos de um banco de dentes e submersos por 14 dias no meio de cultura bacteriana de *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Enterococcus faecalis*. A cada três dias, o meio foi trocado e monitorado. Em alguns grupos, durante a troca dos meios de cultura, foi adicionado soro humano ou colágeno ao meio e a capacidade das três bactérias de penetrar nos túbulos dentinários e aderirem ao colágeno foi observada após coloração de *Brown & Brenn* no microscópio. Os resultados evidenciaram que *E. faecalis* é capaz de invadir os túbulos dentinários por aderência ao colágeno na presença de soro humano, fato que pode acrescentar explicações do porquê de sua sobrevivência durante os procedimentos químicos e mecânicos, assim como na presença de medicamentos intracanaís.

Pinheiro, Gomes e Drucker (2004) analisaram a presença de *Enterococcus* spp. em canais infeccionados com lesão perirradicular. Foram utilizados para o estudo 60 dentes desobturados e em seguida analisados microbiologicamente. Os

resultados indicaram a presença de micro-organismos em cinquenta e um dentes após a desobturação e destes, 27 apresentavam *Enterococcus faecalis* associados a outros micro-organismos e 18 *E. faecalis* sozinhos (cultura pura), portanto, os autores concluíram que *E. faecalis* está associado ao insucesso do tratamento endodôntico.

Ferrari *et al.* (2005) constataram a presença de *Enterococcus faecalis*, bactérias entéricas e leveduras em canais com infecção primária antes e após o tratamento finalizado. Utilizaram 25 dentes unirradiculares hígidos, porém com lesão perirradicular sem presença de fístula e assintomático. Realizada a abertura coronária, foi coletada a primeira amostra, com auxílio de cones de papel estéreis. Posteriormente os canais foram irrigados e se coletou a segunda amostra igual à primeira. O dente foi selado e após sete dias foi realizada a terceira coleta e novamente ocorreu instrumentação e preenchimento do interior do canal utilizando-se paramonoclorofenol como medicação. Decorridos sete dias, realizou-se a quarta coleta e a obturação final foi realizada. Através de testes bioquímicos, as bactérias foram identificadas e cada amostra foi semeada em diferentes meios de cultura. Na primeira coleta, 23 (92%) micro-organismos foram isolados e em três deles havia *E. faecalis*. Na segunda coleta, apenas cinco dentes apresentaram micro-organismos exceto os alvos. Após os sete dias de medicação, quando foi feita a terceira coleta, 25 dentes apresentaram micro-organismos e em 12 havia *E. faecalis* associados a outros e em nove, *E. faecalis* sozinhos (culturas puras). Por fim, na quarta coleta, ainda havia a presença de *E. faecalis* em três canais, demonstrando a resistência do *E. faecalis* nas infecções endodônticas.

Efetividade da infecção por *E. faecalis* e por outras bactérias envolvidas nas infecções orais envolve fatores ligados a seu ambiente, à interação entre a bactéria e o meio ambiente e às suas fontes nutricionais.

Os nutrientes necessários ao crescimento bacteriano são resultantes da fermentação de carboidratos, de aminoácidos e peptídeos, além de componentes do sangue da polpa (SIQUEIRA *et al.* 2004). *Peptostreptococcus micros* (*P. micros*) apresenta atividade enzimática proteolítica capaz de fornecer aminoácidos e peptídeos para o próprio metabolismo, assim como no metabolismo de outras espécies bacterianas, inclusive aumentando a patogenicidade de outras bactérias (SIQUEIRA-JUNIOR *et al.* 2003). A vitamina K e a hemina são componentes importantes para o crescimento e desenvolvimento dos gêneros *Prevotella* e

Porphyromona que podem ser produzidos por outras bactérias através da quebra de hemoglobina, como por exemplo, a *Campylobacter rectus* (*C. rectus*) que produz hemina, enquanto *P. endodontalis*, *P. micros*, *Selenomonas sputigena* (*S. sputigena*), *F. nucleatum* e *Actinomyces* sp. produzem substâncias essenciais a *C. rectus* (SIQUEIRA-JUNIOR, RÔÇAS 2003a). A quantidade de oxigênio presente no interior dos canais radiculares também interfere no desenvolvimento e crescimento microbiano, uma vez que baixas quantidades de oxigênio favorecem o crescimento de bactérias anaeróbias. O pH pulpar varia entre 7,2 e 7,4, entretanto, em condições infecciosas agudas, o mesmo torna-se ácido entre 6,5 e 5, enquanto em condições infecciosas crônicas assume valores de alcalinidade. A maioria das bactérias podem sobreviver em condições de pH entre 6 e 7,4 compatível com os valores observados na polpa necrótica (LOPES, SIQUEIRA-JUNIOR 1999). Outro fator importante é a interação bacteriana positiva e negativa. O comensalismo e sinergismo fazem parte das interações positivas, cuja espécie bacteriana é favorecida por outra sem prejuízo às mesmas. Já a competição e o antagonismo são interações negativas que geram ambiente seletivo, por exemplo *C. rectus* apresenta interação positiva com *P. endodontalis*, *P. micros*, *S. sputigena*, *F. nucleatum*, *Actinomyces* sp. e *Eubacterium* sp., enquanto *Dictester pneumosintes* (*D. pneumonintes*) apresentam interação negativa com *B. forsythus*, *P. gingivalis* e *Actinomyces israeli* (*A. israeli*) (SIQUEIRA-JUNIOR, RÔÇAS 2003 a,b). Dentre as substâncias antagonistas produzidas por bactérias, existe a bacteriocina, que é liberada por alguns micro-organismos, como a *Enterococcus faecalis*. Esta substância possui capacidade de inibir o crescimento e desenvolvimento de outras espécies microbianas. As bacteriocinas são proteínas antimicrobianas específicas de bactérias Gram-positivas e gram-negativas que se ligam a receptores específicos na superfície das células bacterianas, criando um verdadeiro ambiente de competição devido à mudança ecológica no interior do canal radicular (RILEY, WERTZ 2002). A principal bacteriocina originalmente isolada de *E. faecalis* é a AS-48 e apresenta atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Outras bacteriocinas, como 21, 31 e Bc-48, enterocinas 226NWC, 4, EFS2, 1071A, 1071B e SE-K4 foram isoladas e apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas (KAYAOGLU, ORSTAVIK 2004).

2.4 Soluções irrigadoras antimicrobianas utilizadas no tratamento da cárie, infecções periodontais e endodônticas

2.4.1 Digluconato de clorexidina 0,12% e 2%

Digluconato de clorexidina é um bis-biguanídeo catiônico de largo espectro antimicrobiano com uma estrutura molecular constituída de uma ponte hexametilênica com grupos terminais de 4-clorofenil e nome científico 1, 1-bis hexametileno (5-p-clorofenilbiguanida) di-D-gluconato e nome genérico clorexidina (Figura 5). Apresenta como fórmula molecular $C_{22}H_{30}Cl_2 N_{10}$ e massa molecular 505,446 g/mol. Quando usada em altas concentrações, tem um efeito bactericida imediato durante a limpeza. A clorexidina penetra na parede da célula bacteriana e leva à precipitação do citoplasma (HENNESSEY 1973). Os níveis de clorexidina necessários para exercer efeito bactericida variam conforme a espécie bacteriana. As moléculas carregadas positivamente ligam-se às paredes das células bacterianas carregadas negativamente, principalmente aos grupos fosfato presentes nos lipopolissacarídeos e ao grupo carboxil nas proteínas (HUGO, LONGWORT 1996), interferindo assim, no transporte de membrana.

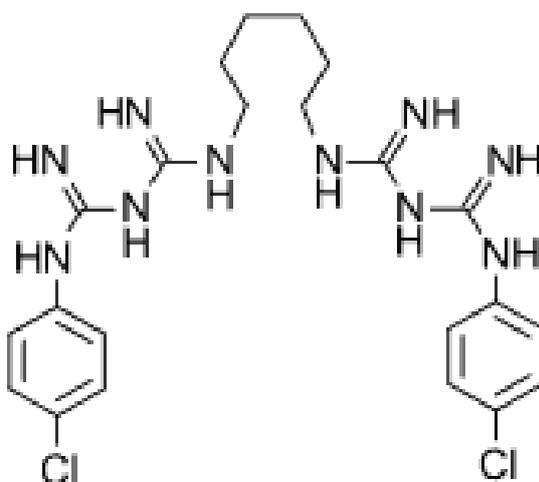


Figura 5. Fórmula estrutural da clorexidina

Fonte: Clorexidina

Disponível em: <http://www.zirael.org/bkchem> BKchem

Acesso em: 25 de fevereiro de 2009.

A clorexidina glicosada, em uma concentração de 0,2%, é amplamente usada na prática dental como enxaguatório oral devido à sua atividade contra uma extensa gama de espécies microbianas orais (SALEM *et al.* 1987). É retida na superfície oral pela ligação eletrostática reversível às glicoprotéínas (DAVIES, 1973). Pequenas quantidades de clorexidina na boca liberam moléculas em concentrações bacteriostáticas durante um período prolongado que pode durar várias horas e quantidades pequenas, mas significantes, são retidas na placa da superfície do dente (BONESVOLL, GJERNO 1974), o que pode interferir na adesão bacteriana pela inativação da glicosiltransferase (Sheie; Kjeilen, 1987) e pela competição com íons de cálcio nos lugares de retenção (RÖLLA, MELSEN 1975).

Kjaerheim *et al.* (1994) explicaram que a clorexidina, quando utilizada como colutório, forma uma monocamada estável na superfície do dente e na mucosa oral. Quando aplicada somente na superfície do dente, produz um efeito inibitório da placa.

Emilson (1977) realizou um estudo *in vitro* avaliando a sensibilidade antimicrobiana de vários micro-organismos à clorexidina. Foram avaliadas 133 cepas de 21 bactérias coletadas do biofilme dental supragengival e da saliva. As cepas de *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* apresentaram menor sensibilidade.

Resultados de estudos do controle químico do biofilme dental mostram que o digluconato de clorexidina é o mais efetivo agente antiplaca (YATES, JENKINS 1993). Esta substância é bactericida contra espécies Gram-positivas, Gram-negativas e fungicida nas leveduras. Suas propriedades antibacterianas aliadas a substantividade são altamente significantes para o efeito inibidor de placa (LANG; GROSSMAN 1981).

A clorexidina mostrou ser capaz de prevenir o desenvolvimento de gengivite e melhorar as inflamações gengivais induzidas experimentalmente (RAMFJORD, 1991), bem como apresentam ação antimicrobiana como solução irrigadora nos processos de desinfecção dos canais radiculares.

Durante o tratamento periodontal, os bochechos com 15 mL solução de clorexidina 0,12% por um minuto auxiliam no controle da gengivite e periodontite (VAN DER WEIJDEN *et al* 2005).

Zanatta *et al* (2007) avaliaram o efeito da clorexidina em superfícies dentais com presença e ausência de biofilme supragengival. Para isso, avaliaram 20 indivíduos com presença de biofilme dental acumulado por 96 horas, ou seja, sem

escovação dentária neste período. Dividindo a arcada dentária superior e inferior em dois quadrantes, removeram a placa com escovação de um quadrante, enquanto do outro não. Este procedimento foi repetido por 21 dias aliados aos bochechos de clorexidina 0,12% após a higienização do quadrante selecionado. Os resultados encontrados revelaram quantidades maiores de placa no lado sem escovação, quando comparado ao lado higienizado, mesmo após os bochechos com clorexidina. O sangramento do lado sem escovação também foi significativamente maior. Assim, os autores concluíram que, independente do uso da clorexidina 0,12%, o seu efeito é reduzido devido à presença de biofilme, e os efeitos colaterais da clorexidina, como alteração de cor, foram evidenciados no lado com presença de placa bacteriana, o que reforça a necessidade de escovação dentária mesmo quando há uso de bochecho de clorexidina.

Segundo Ruano, Ciamponi (2002), a clorexidina também é indicada como agente desinfectante de cavidades após preparo cavitário protegendo a estrutura dentária de sensibilidade pós-operatória, recorrência de cárie e, principalmente, atuando como antimicrobiano. O digluconato de clorexidina 2% é um desinfectante efetivo e extensivamente indicado.

Quando as bactérias residuais da lesão de cárie conseguem profiferar no interior do *smear layer*, independentemente do selamento cavitário, há difusão de toxinas em direção à polpa, resultando em irritação e conseqüentemente inflamação e infecção pulpar. Este fato justifica o uso da clorexidina como agente antimicrobiano a ser usado antes da restauração definitiva (RABELLO, COELHO 1998).

O sucesso do tratamento endodôntico depende da remoção do conteúdo do interior dos canais radiculares, tornando o ambiente o mais asséptico. Para isso realiza-se o preparo biomecânico dos canais radiculares, que inicia-se por meio da instrumentação mecânica através de limas endodônticas apropriadas com ação de corte e remoção de tecidos e substâncias químicas com propriedades desinfectantes e antimicrobianas (Figura 6). Este processo de desinfecção pode não eliminar os micro-organismos responsáveis pelas infecções aguda e crônica, tampouco aqueles envolvidos no processo de lesões periapicais. Quando estes agentes se propagam nos canais acessórios, túbulos dentinários, canais colaterais e ápice radicular podem ocorrer as lesões periradiculares (LEONARDO 2000).

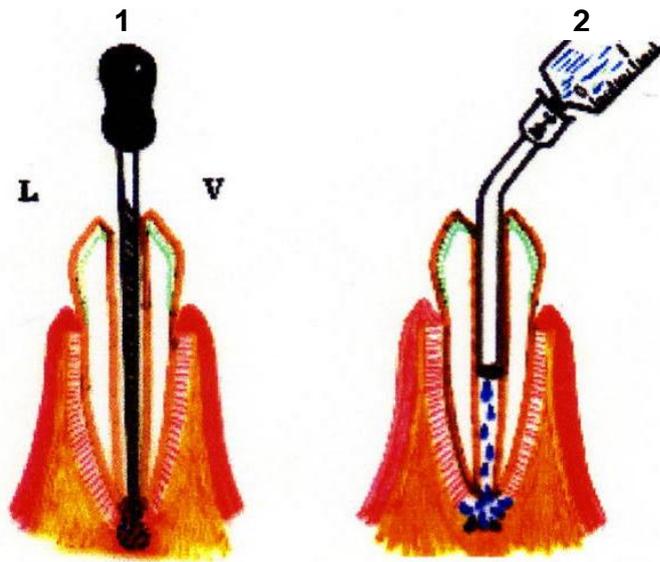


Figura 6. Preparo Biomecânico dos canais radiculares (instrumentação mecânica e irrigação química e aspiração do conteúdo intracanal). **Legenda:** 1. Lima endodôntica utilizada para remover os resíduos do interior do conduto radicular; 2. Irrigação com substância química e propriedades antimicrobianas.

Segundo Fachin *et al.* (1994), uma solução irrigadora utilizada na desinfecção de canais radiculares deve apresentar propriedades capazes de eliminar os microorganismos do canal radicular, neutralizar substâncias tóxicas liberadas pelas bactérias, ser eficaz em contato com sangue e secreção purulenta, não ser tóxica aos tecidos adjacentes e ao tecido vivo, penetrar nos túbulos dentinários (0,5 mm), não alterar a cor do dente e, se possível, ser de baixo custo. As substâncias mais comumente utilizadas são digluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 1%. Tais propriedades não são totalmente obedecidas pelos dois produtos.

O líquido irrigante promove uma circulação no interior do canal soltando os resíduos pulpares e as raspas de dentina, e deve ser aspirado concomitantemente à irrigação.

Ringel *et al.* (1982) realizaram *in vivo* o tratamento endodôntico em 60 dentes unirradiculares necrosados e infectados em três sessões. Nas duas primeiras sessões efetuaram o preparo químico-mecânico empregando-se digluconato de clorexidina 0,2% e hipoclorito de sódio 2,5% como soluções irrigadoras. Durante os procedimentos, foram coletadas amostras para avaliar o poder antimicrobiano das substâncias. Na terceira sessão, obturaram os canais. Para os anaeróbios, o

hipoclorito mostrou-se mais efetivo, e para os aeróbios, ambas as soluções apresentaram resultados semelhantes, ressaltando um aumento no número de colônias *in vitro* entre as sessões. Esse fato foi evidenciado nos espécimes irrigados com clorexidina, o que demonstrou que esta é menos efetiva que o hipoclorito de sódio para manter um prolongado efeito antibacteriano após a irrigação.

Orstavik, Haapasalo (1990) estudaram *in vitro* o efeito de soluções irrigadoras e de medicamentos intracanal contra bactérias, presentes na dentina bovina, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, *Escheria coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Peças cilíndricas foram obtidas da dentina de raízes dos incisivos bovinos recém extraídos, cujo cemento foi intencionalmente removido durante o procedimento. Removeram-se resíduos orgânicos e inorgânicos, incluindo a camada residual de *smear layer*, e os cilindros de dentina foram autoclavados antes da infecção com os micro-organismos. O período de incubação variou de três a seis semanas. Os medicamentos de uso intracanal utilizados na desinfecção foram hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado, clorexidina, iodoiodeto de potássio, hipoclorito de sódio 5,25% e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a aplicação da medicação, os espécimes foram incubados a 37% por períodos de cinco minutos a sete dias, e os tubos que não mostraram crescimento bacteriano foram reinoculados e incubados por outros sete dias. A eficácia dos medicamentos variou significativamente e dependeu da espécie bacteriana utilizada. Os resultados analisados, levando-se em conta a capacidade dos micro-organismos de infectar e colonizar os túbulos dentinários, mostraram que o paramonoclorofenol canforado foi mais eficiente que o hidróxido de cálcio e que, entre as soluções irrigadoras, o iodeto de potássio foi mais efetivo que o hipoclorito de sódio e a clorexidina. A presença do *smear layer* retardou, porém sem eliminar o efeito dos medicamentos testados.

Helling *et al.* (1992) compararam *in vitro* a eficácia de um dispositivo de liberação controlada contendo 25 mg de clorexidina e da solução de clorexidina 0,2% como medicação intracanal. Todas as espécies controle, de cada período testado (cinco minutos, 24 horas, 40 e 48 horas e sete dias), mostraram um constante nível de infecção em todos os níveis de penetração examinados. Os resultados demonstraram que as medicações foram ativas em uma profundidade de dentina de até 0,5 mm.

Em 1998, Siqueira-Junior *et al.* estudaram o hipoclorito de sódio 0,5%, 2,5% e 4,0%, clorexidina 0,2% e 2%, ácido cítrico 10% e EDTA em 17% em bactérias Gram-

negativas anaeróbias e facultativas. Os resultados evidenciaram que o hipoclorito de sódio 4% foi o agente mais eficaz, embora a clorexidina nas duas concentrações tenha inibido o crescimento bacteriano, mas em menor atividade que o hipoclorito 2,5% e 4%. No entanto, a clorexidina não é tóxica independente das concentrações utilizadas, já o hipoclorito de sódio é tóxico e irritante nas maiores concentrações, entretanto, é capaz de eliminar matéria orgânica, propriedade que a clorexidina não possui.

Buck *et al.* (1999) utilizaram dentes humanos extraídos e avaliaram o poder antibacteriano de várias soluções irrigadoras. Concluíram que a efetividade na desinfecção do canal depende do tipo de micro-organismo infectante.

Guimarães (2001) avaliou o efeito da clorexidina 2% sob as formas de gel e aquosa sobre as cepas de *E. faecalis*. Independentemente do veículo usado na manufatura do medicamento, a clorexidina apresentou resultados estatísticos significantes contra a bactéria na concentração de 2%.

Silva *et al.* (2002) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio 1 e 2,5% e clorexidina 0,12 e 2% através do teste por contato (imediate, 10, 20 e 30 minutos) com as substâncias contra *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli* e em todos os tempos as duas substâncias foram eficazes. Os autores concluíram que o tempo de exposição da cepa à substância antimicrobiana, independente da concentração, pode influenciar no resultado.

Estrela *et al.* (2003b) testaram *in vitro* a atividade antimicrobiana das soluções comercializadas de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 2% por meio do disco difusão em ágar e teste de exposição direta contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *C. albicans*, *E. faecalis* e uma mistura de todas. Os inóculos, em ambos modelos, foram preparados a uma concentração de suspensão bacteriana 3×10^8 UFC/mL. No modelo de disco difusão, a clorexidina formou halo de inibição em todas as cepas e na mistura de cepas. Contudo o hipoclorito de sódio 2% não formou halo de inibição na *B. subtilis* e na mistura de cepas. O halo de inibição da clorexidina na *E. faecalis* (18 mm) foi maior que no hipoclorito de sódio (12 mm). No teste de exposição direta não ocorreu crescimento da *E. faecalis* em nenhum dos tempos testados (5, 10 e 30 minutos), mas a *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e a mistura cresceram em todos os tempos na presença das duas substâncias. A partir destes dados, os autores concluíram que tanto a clorexidina, como o

hipoclorito de sódio são duas substâncias importantes no controle da *E. faecalis*, mas o método experimental, as características do micro-organismo e o tempo de exposição podem influenciar nos resultados.

Estrela *et al.* (2004) estudaram a eficácia antimicrobiana do digluconato de clorexidina formulado em diferentes concentrações e procedências por intermédio de teste de difusão em ágar. Inocularam-se 30 placas de Petri com 0,1 mL da suspensão microbiana com o auxílio de *swabs* esterilizados, e os micro-organismos foram espalhados no meio, obtendo-se um crescimento confluyente. A suspensão microbiana foi obtida da mistura de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *C. albicans*. Imergiram-se 90 discos de papel com 9,0 mm de diâmetro por um minuto nas soluções experimentais: Gelplak® (gel de clorexidina 1%), Cav Clean® (solução de clorexidina 2%), solução aquosa de clorexidina 2% e Endogel® (gel de clorexidina 2%). Para cada placa foram colocados três discos de papel sobre a superfície do meio de cultura. As placas foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente e então foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados mostraram que todas as soluções testadas apresentaram eficácia antimicrobiana sobre todos os indicadores biológicos com valores médios dos halos de inibição entre 16 e 25 mm.

Bevilacqua, Habitante e Cruz (2004) realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de justificar o uso da clorexidina no tratamento de infecções endodônticas e encontraram as mais diversas opiniões sobre o assunto. A clorexidina gel ou solução 2% é a substância mais efetiva contra diversos micro-organismos, além de ser atóxica e apresentar baixa tensão superficial. O hipoclorito de sódio, nas mesmas concentrações, não foi capaz de inibir as bactérias com a mesma eficácia da clorexidina.

Dametto *et al.* (2005) compararam a irrigação do canal radicular com clorexidina gel e solução 2% e hipoclorito de sódio 5,25%. Oitenta raízes de pré-molares extraídos foram modeladas (instrumentadas), autoclavadas e contaminadas com *E. faecalis* por sete dias. As amostras foram avaliadas antes, logo após e sete dias após a instrumentação. A clorexidina gel ou solução 2% foi mais efetiva na redução dos micro-organismos quando comparada ao hipoclorito de sódio.

Schäfer, Bossman (2005) investigaram *in vitro* a eficácia da solução de clorexidina 2%, do hidróxido de cálcio e da associação dessas substâncias perante *E. faecalis*. O soro fisiológico foi usado no grupo controle. Após a instrumentação e a

remoção do *smear layer* mecânica e quimicamente, foi feita a inoculação da bactéria estudada e os dentes foram medicados. Os espécimes ficaram incubados por três dias. Em seguida, todos os canais foram reinstrumentados a diâmetros maiores e a dentina foi removida para análise microbiológica. A clorexidina foi significativamente mais eficiente que as demais substâncias contra o micro-organismo em questão.

Estudos tentam comprovar a eficácia da clorexidina na eliminação de *E. faecalis*. Entre trabalhos existentes, há o de Ringel *et al.* (1982), que ao realizarem estudo comparativo *in vivo* da efetividade da clorexidina 0,2% e do hipoclorito de sódio 2,5% verificaram que o número de colônias entre sessões foi maior no grupo de pacientes tratados com a clorexidina quando compararam o grau de redução microbiana após o preparo químico-mecânico de canais radiculares humanos contendo tecido pulpar necrótico utilizando o hipoclorito de sódio 2,5% ou o gel de clorexidina 2%.

Lenet *et al.* (1999) e Lenet *et al.* (2000) observaram que a clorexidina apresentou atividade por 21 dias, diferentemente de Almyroudi *et al.* (2002), que verificaram um tempo de atuação de 14 dias. Já Parsons *et al.* (1980) notaram que a clorexidina permaneceu atuante por um período de sete dias.

Magro Filho *et al.* (1998) constataram que a solução de clorexidina 0,2% possui baixa toxicidade. Enquanto Santos *et al.* (2000) avaliaram tanto a clorexidina solução como em gel nas concentrações 0,12%, 0,2%, 1%, 2% e 5% e mostraram que o gel, nas concentrações 0,12% e 0,2%, é menos tóxico que as demais concentrações estudadas, discordando do trabalho de Kalil *et al.* (2000) classificaram a solução de clorexidina 2% como uma substância não tóxica.

Jeansonne, White (1994) e Menezes *et al.* (2003) indicaram o uso de clorexidina como substância auxiliar na desinfecção do canal radicular em pacientes alérgicos ao hipoclorito de sódio e em casos de rizogênese incompleta, por causa da sua relativa ausência de toxicidade, confirmada também por Greenstein *et al.* (1986); White *et al.* (1997); Ferraz *et al.* (2000); Gomes *et al.* (2001); Machado-Junior *et al.* (2001); Almyroudi *et al.* (2002).

2.4.2 Hipoclorito de sódio 1%

O uso do hipoclorito de sódio, na história, data de 1792 e seu primeiro nome foi água de Javele, uma mistura constituída de hipoclorito de sódio e de potássio. Posteriormente Dakin após diversas análises clínicas e químicas propôs uma solução mais neutra que se tornou conhecida pelo nome de líquido de Dakin (solução diluída em 0,5%). O que se observa é que não existe uma unanimidade entre os endodontistas sobre qual a concentração ideal do hipoclorito de sódio em seu emprego como agente irrigador (BORIN, BECKER, OLIVEIRA 2007).

Dentre as soluções empregadas no tratamento das infecções endodônticas, o hipoclorito de sódio é uma das substâncias de eleição, especialmente por suas propriedades antimicrobianas. Contudo, há limitações, como sabor e odor desagradáveis, tóxico principalmente se entrar em contato com os tecidos perirradiculares e ineficiência na remoção do *smear layer* das paredes dentinárias (FACHIN, HAHN, PALMINI 1994; YESILSOY *et al.* 1995; HELLING *et al.* 2001; SHABAHANG, POURESMALL, TORABINEJAD 2003).

Sassone *et al.* (2003) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio 1 e 5% e solução de clorexidina 0,12, 0,5 e 1% contra cepas *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*. Foram realizados teste por contato em quatro intervalos de tempo diferentes (imediatamente, 5, 15 e 30 minutos após o contato) e repetido 10 vezes para confirmação dos resultados. Para tanto, foram utilizadas concentrações de suspensões bacterianas 1×10^9 UFC/mL. Os resultados evidenciaram a eficácia do hipoclorito de sódio 1 e 5% contra *E. faecalis* nos quatro tempos estudados. A clorexidina 0,5% apresentou atividade antimicrobiana 5, 15 e 30 minutos após o contato e a clorexidina 1% apresentou efetividade nos quatro tempos, entretanto a diluída em 0,12% não foi eficaz em nenhum dos tempos testados. Frente aos resultados, os autores concluíram que a clorexidina na concentração 0,12% não apresenta atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* no modelo experimentado em nenhum dos tempos expostos, mas apresentou atividade contra *E. faecalis* quando utilizadas nas demais concentrações.

Sassone *et al.* (2008) em continuidade aos estudos realizados em 2003, continuaram avaliando a atividade antimicrobiana da clorexidina e do hipoclorito de

sódio nas mesmas concentrações anteriormente utilizadas contra as cepas *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, porém adicionando material orgânico (soro de albumina bovino) ao meio de cultura. No teste de contato, a clorexidina 0,12% pura e com adição de material orgânico não foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis* em todos os tempos testados. Na concentração de 0,5% enriquecida de material orgânico, somente ocorreu inibição imediatamente e 5 minutos após o contato, enquanto a solução 1% inibiu o crescimento de *E. faecalis* nos meios com ou sem material orgânico. O hipoclorito de sódio 1 e 5% foram efetivos contra *E. faecalis* nas duas formas utilizadas. No teste de disco difusão em ágar, o hipoclorito de sódio 1% e 5% acrescido de material orgânico não foram capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis*, mas a clorexidina em todas as concentrações testadas, acrescida ou não de albumina, inibiu o crescimento de *E. faecalis* (exceto 0,12%). Os autores concluíram que a presença de material orgânico pode interferir na atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras.

A Tabela 3 descreve as denominações do hipoclorito de sódio, em função de suas concentrações.

Tabela 3. Soluções de hipoclorito de sódio e denominações segundo as diferentes concentrações (BORIN, BECKER, OLIVEIRA 2007)

DENOMINAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Líquido de Dakin	Solução de hipoclorito de sódio 0,5% neutralizada por ácido bórico
Líquido de Dausfrene	Solução de hipoclorito de sódio 0,5% neutralizada por bicarbonato de sódio
Solução de Milton	Solução de hipoclorito de sódio 1% estabilizada por cloreto de sódio 16%
Licor de Labarraque	Solução de hipoclorito de sódio 2,5%
Soda Clorada	Solução de hipoclorito de sódio de concentração variável entre 4 e 6%
Água Sanitária	Solução de hipoclorito de sódio 2 – 2,5%

As condições de armazenamento dos frascos contendo hipoclorito de sódio são tão importantes que o ideal é utilizar uma solução manipulada ou recém preparada com validade de uma semana e armazenamento sob refrigeração para que o teor de cloro não seja perdido quando comparado às soluções em temperatura ambiente (Pécora et al. 1987; Santos, 1999) e, quanto maior for a concentração inicial de cloro, mais rapidamente ele é degradado (OLIVEIRA, FIGUEIREDO, PIRES 2003).

A dissertação de mestrado de Estrela, 2000, foi baseada na avaliação da atividade antimicrobiana de soluções usadas para irrigação na terapia endodôntica sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas do hipoclorito de sódio 1%, 2% e 5%, clorexidina 2%, hidróxido de cálcio 1% e hidróxido de cálcio 1%, 0,2% e do detergente HCT 20 em modelos que expuseram diretamente os micro-organismos pelo período de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. A Concentração Inibitória Mínima - CIM do hipoclorito do sódio 1%, 2% e 5% frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foi igual a 0,1% e para *Bacillus subtilis* igual a 1%. Todos os micro-organismos foram sensibilizados pelas soluções testadas em todos os períodos. A CIM da clorexidina 2% foi igual a 0,000002% para *Staphylococcus aureus*, 0,002% para *Pseudomonas aeruginosa*, 0,02% para *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis*. No caso da clorexidina, a efetividade antimicrobiana foi verificada em todos os períodos somente contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Candida albicans*, e foi observada uma inefetividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. O hidróxido de cálcio 1% variou conforme a bactéria, sendo que contra *Pseudomonas aeruginosa* a CIM foi igual a 1% e para os demais micro-organismos, maior que 1%. No período de exposição de 30 minutos, somente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Pseudomonas aeruginosa* foram sensibilizadas, enquanto *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* não foram sensibilizados em nenhum dos tempos testados. A mistura de hidróxido de cálcio e detergente HCT 20 apresentou CIM igual a 4,5 mL contra todos os micro-organismos, exceto *E. faecalis*, que necessitou de uma quantidade superior a 4,5 mL, embora haja duas substâncias, que apresentam ação antimicrobiana, incorporadas ao detergente, que podem interferir neste resultado.

Vianna *et al.* (2006) determinaram, no estudo *in vivo*, o grau de redução microbiana após o preparo químico-mecânico de canais radiculares humanos com tecido pulpar necrosado com uso de hipoclorito de sódio 2,5% e gel de clorexidina 2%. Trinta e dois pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com as soluções irrigadoras. Os canais radiculares foram instrumentados, e coletas microbianas foram realizadas para a análise da redução microbiana. Apesar de ambas as substâncias obterem sucesso na redução do número de micro-organismos, na maioria dos casos (96%), o hipoclorito de sódio 2,5% foi superior na redução de micro-organismos tanto pela contagem das UFC/mL - unidades formadoras de colônias por mililitro, quanto pelo *real-time quantitative-polymerase chain reaction* - RTQ-PCR. O hipoclorito de sódio, além de ter apresentado maior ação contra os micro-organismos, foi também mais hábil em remover células do canal radicular.

Abdullah *et al.* (2005) testaram a efetividade do hipoclorito de sódio 3%, clorexidina 0,2%, hidróxido de cálcio e povidine iodado 10% em cepas de *E. faecalis* isoladas de canais infectados com presença de lesão perirradicular *in vivo* cujo material coletado do interior dos canais apresentavam-se sob a forma de biofilme, suspensão fenotípica planctônica ou uma suspensão preparada e centrifugada. Após 2 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio 3% *in vitro*, 100% das cepas de *E. faecalis* foram eliminadas.

Tomazinho *et al.* (2007) realizaram um trabalho no qual testaram *in vitro* clorexidina 0,12% e 2%, EDTA 17%, água oxigenada 10 volumes e hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5% e 5% sobre a *E. faecalis* pelo método de disco difusão. A clorexidina 2% foi a substância mais efetiva, seguida do hipoclorito de sódio 5%, clorexidina 0,12%, hipoclorito de sódio 2,5% e 1%. Os autores correlacionaram os resultados *in vitro* obtidos à clínica, visando o sucesso do tratamento endodôntico. O hipoclorito de sódio 2,5% e 5% é altamente tóxico. Sendo assim, há vantagens e desvantagens frente às soluções irrigadoras propostas para a descontaminação radicular, vale ressaltar a avaliação de cada caso, segundo os autores.

2.5 Plantas da Amazônia e Mata Atlântica com propriedades antimicrobianas

Estima-se que o Brasil detém 20% da biodiversidade terrestre (Wilson, Peter, 1988). Pouco se sabe sobre o potencial farmacológico e fitoquímico das plantas brasileiras. Para que este conhecimento seja adquirido, estudos em larga escala devem ser feitos, preferencialmente aqueles que podem ser realizados em curto espaço de tempo. Esta técnica, conhecida como triagem em alta escala, do inglês *high throughput screening*, é eficaz, considerando-se o elevado número de amostras a serem testadas, a diminuição do custo de pesquisa, o modo mais focado de se obter resultados, o tempo necessário para se chegar ao resultado e a rapidez com que as florestas são exterminadas, no mundo (SUFFREDINI et al. 2006b).

A revisão de literatura realizada por Lansky, Shubert e Neemam (2004) revela diversas propriedades da romã. A fruta, caule e raiz possuem taninos indicados para o tratamento de diarreias, lesões genitais e orais, as sementes possuem estrogênios esteroidais, fitoestrogênio não esteroidal e inibidores da ciclooxygenase capazes de promover atividade antiinflamatória, por agirem na cascata antiinflamatória, e as cascas atuam como bactericida, antivirótico e antitumoral.

Suffredini *et al.* (2004) realizaram um estudo cujo objetivo principal foi a triagem de 705 extratos orgânicos e aquosos obtidos de plantas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica Brasileira, com atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os autores encontraram apenas 3 extratos ativos, cujos resultados foram: um extrato ativo contra *S. aureus* e dois extratos ativos contra *E. faecalis*.

Lima Junior *et al.* (2005) investigaram, por meio de questionários, o uso de plantas medicinais pela população (com ênfase nas afecções bucais), a porcentagem de aplicação desses produtos nos cuidados bucais e quais as indicações e formas de utilização das plantas referidas. Os resultados apontaram que embora os entrevistados possuam baixo grau de instrução, há um grande conhecimento popular das plantas medicinais e que as informações relativas à indicação e forma de uso não divergem da literatura científica. Assim, 49,5% dos entrevistados fazem uso das plantas para afecções bucais como inflamações, odontalgias e processos cicatriciais e as formas mais comuns de utilização são por decocção, maceração e infusão.

Pereira *et al.* (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Punica granatum* (romã) sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) e *Lactobacillus casei* (*L. casei*). Além disso, avaliaram *in vivo* a ação antimicrobiana do extrato da romã na forma de um dentifrício. Os resultados *in vitro* demonstraram que o extrato de *P. granatum* produziu uma significativa atividade antimicrobiana sobre os microorganismos,, evidenciando a eficácia do extrato quando comparados aos obtidos pelo digluconato de clorexidina. Foi apontado efeito inibitório sobre *L. casei*, seguido pelo *S. mitis*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis* e melhores resultados quando comparados aos da clorexidina. No estudo *in vivo* ocorreu a redução significativa do índice de sangramento gengival e de *S. mutans* quando comparado com um dentifrício controle, no entanto não ocorreu redução no índice de placa.

Araújo *et al.* (2005) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do extrato da casca de *Anacardium occidentale* Linn (cajueiro) sobre quatro cepas de leveduras *Candida*, em estudo comparativo com o digluconato de clorexidina 0,12%. Os resultados mostraram efeitos antifúngicos sobre duas das cepas. Em contra partida, a clorexidina apresentou atividade sobre todas as cepas, o que destaca a importância de se estudar novos meios alternativos e de baixo custo como terapêutica na Odontologia.

Em 1999, Ferreira testou *in vitro* a capacidade antimicrobiana de própolis frente às cepas bacterianas *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium perfringens* e *Actinomyces israeli* e observaram o efeito bactericida em todas.

Gentil *et al.* (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma solução fitoterápica de *Arctium lappa* como medicação intracanal em comparação ao hidróxido de cálcio, contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans*, e *Candida albicans*. Os autores se basearam no fato de *A. lappa* ser utilizada extensamente na medicina popular ao longo dos anos, como agentes antibacteriano, fungicida, entre outros. Os resultados apontaram a maior eficácia da solução fitoterápica de *A. lappa* quando comparados ao hidróxido de cálcio e ao grupo controle.

Teixeira (2006) comparou as propriedades antimicrobianas dos curativos de demora utilizados na terapia endodôntica, como paramonoclorofenol canforado, furacinado, formocresol, tricresol-formalina, clorexidina e pastas de hidróxido de

cálcio, com as substâncias naturais, como o própolis, óleo de copaíba, ozônio e mamona. Os resultados foram satisfatórios, demonstrando que os curativos de demora podem ser substituídos pelos produtos naturais testados.

Sponchiado Junior (2006) estudou a atividade antimicrobiana contra *E. faecalis in vitro* de uma medicação intracanal contendo fitoterápico de *Pothomorphe umbellata* em teste de difusão em ágar, bioautografia e análises microbiológicas em canais radiculares. Os resultados encontrados demonstraram que no grupo tratado com medicação à base de hidróxido de cálcio não houve crescimento bacteriano, no grupo tratado com a fração de acetato de etila do extrato de *P. umbellata* ocorreu inibição bacteriana nos períodos após sete, quatorze e vinte e oito dias e o outro grupo considerado controle permaneceu positivo já que nenhum medicamento foi adicionado. Por um período de vinte oito dias, tanto a fração de *P. umbellata* como o hidróxido de cálcio apresentaram ação antimicrobiana contra a *E. faecalis* em dentes infectados.

Suffredini et al. (2006b) realizaram uma triagem com 1220 extratos vegetais amazônicos pertencentes a mais de 350 espécies de 71 famílias diferentes de plantas das florestas Amazônica e Mata Atlântica para avaliar a atividade antimicrobiana dos mesmos contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os resultados obtidos demonstram que 17 extratos foram efetivos contra as bactérias testadas em doses menores que 200 µg/mL. *Rapanea pavifolia* apresentou CIM = 30µg/mL e Concentração Bactericida Mínima - CBM = 60 µg/mL contra *E. faecalis*. Os extratos orgânicos de *Gnetum leyboldii*, *Virola theiodora*, *Psidium densicomum* e *Palicourea guianensis* apresentaram CIM = 40 µg/mL e CBM ≤ 100 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Suffredini et al. (2007) identificaram e avaliaram a CIM e a CBM dos três extratos ativos contra as cepas estudadas, encontrados no trabalho realizado anteriormente com 705 extratos de plantas no mesmo modelo experimental. Os resultados obtidos foram os seguintes: *Rapanea parvifolia* e *Smilax rufescens* mostraram efetividade contra *E. faecalis* CIM = 30 µg/mL; CBM = 60 µg/mL e CIM = 80 µg/mL; CBM = 90 µg/mL, respectivamente. *Ruizterania retuza* mostrou atividade contra *S. aureus* CIM = 140 µg/mL CBM = 160 µg/mL e leve atividade contra *P. aeruginosa* CIM = 200 µg/mL CBM = 380 µg/mL.

Alves *et al.* (2008) realizaram um estudo cujo escopo era avaliar a eficácia das principais metodologias empregadas para triagem que envolvem extratos vegetais e substâncias padrão. Utilizando os métodos rotineiramente indicados, difusão em ágar pela técnica do poço, do disco e do *template*, e microdiluição em caldo, avaliou-se a atividade antimicrobiana das partes aéreas do vegetal que resultaram em extratos etanólicos e diclorometânicos da *Miconia rubiginosa* (Melastomaceae) e substância padrão (penicilina e gentamicina) contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *Kocuria rhizophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados revelaram que houve inibição na maioria das bactérias utilizando os extratos etanólicos e diclorometânicos de *M. rubiginosa* verificada pelos halos formados ao redor do poço, disco e *template*. Entretanto, contra *E. faecalis*, não houve inibição utilizando 100 e 300 mg/mL do extrato etanólico e 100 e 300 mg/mL do extrato diclorometânico no *template* e 100 e 300 mg/mL do extrato diclorometânico no poço e no disco. Os extratos etanólicos nas duas concentrações testadas contra *E. faecalis* apresentaram diferença estatística significativa entre a técnica do poço e do disco ($p < 0,005$). O CIM obtido do extrato etanólico e diclorometânico contra *E. faecalis* foi de 400 µg/mL.

Inúmeros produtos odontológicos que apresentam extratos vegetais vêm ganhando mercado e estão sendo cada vez mais oferecidos com propósito de inibir ou até mesmo eliminar o crescimento e desenvolvimento de bactérias da cavidade bucal presentes em diversas infecções.

2.6 Ação antimicrobiana de plantas contra *Enterococcus faecalis*

Há mais de 2.500 anos, os chineses utilizam substâncias derivadas de vegetais para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo o uso de uma pasta feita do bolor do feijão de soja no tratamento de infecções e abscessos na pele (GILMAN, GOODMAN, GILMAN 1983), bem como os egípcios utilizavam o pão mofado para tratar ferimentos, segundo Black (2002), e nesta época não existia conhecimento algum sobre os princípios ativos destes produtos.

Aproximadamente 60% dos antibióticos foram introduzidos no mercado de 1983 e 1994 originários de fontes naturais ou sintetizados/semi-sintetizados baseado em produtos naturais (CRAGG, NEWMAN, SNADER 1997).

Buffon *et al.* (2001) avaliaram *in vitro* a eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* como antimicrobianos contra as cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium matruchotr* e compararam ao efeito da solução de digluconato de clorexidina 20%, que serviu de controle positivo. As cepas foram testadas em culturas mistas (todas as cepas juntas) e culturas puras (cepas inoculadas individualizadas) utilizando $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, entretanto, a quantidade de extrato testada em cada disco de papel não foi informada pelos autores. Através do ensaio de disco difusão, as inibições foram avaliadas pelos tamanhos dos halos. A clorexidina 20% apresentou 100% de inibição contra todas as espécies testadas, os extratos não foram ativos contra *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis* e *Proteus mirabilis*. Nas demais cepas os extratos de *Malva sylvestris* e *Calendula officinalis* inibiram em média 16,4% e *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* 13,5% e 10,8%, respectivamente.

Oliveira (2005) avaliou *in vitro* a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini*, conhecida por jambolão, contra diversas cepas bacterianas, dentre as quais *Enterococcus faecalis*. Pelos métodos de disco difusão e microdiluição em caldo foram determinadas a CIM e CBM. No método da DDA os resultados do extrato nas concentrações 100, 200 e 300 mg/mL contra *E. faecalis* não foram significantes pela leitura dos halos, quando comparados à resposta das outras cepas. A CIM apresentou valores entre 70 e 200 µg/mL, sendo o valor para *E. faecalis* igual a 100 µg/mL. O autor sugere que seria necessário uma busca do princípio ativo para considerar realmente o potencial terapêutico.

Girometto (2005) utilizou follhas e talos da erva mate (*Illex paraguariensis* St. Hill) contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Enterococcus faecalis*. Foram testados decoctos dos talos e extratos hidroalcoólicos das folhas e a atividade antimicrobiana foi maior *Salmonella enteritidis* e *Enterococcus faecalis*.

França *et al.* (2005) realizaram um estudo cromatográfico para identificar as substâncias das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). Quatro frações mais a neolignana (diidrocarinatina) foram testadas em cepas selecionadas, identificadas e isoladas pelo laboratório onde o experimento foi realizado, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus flavus*, *Criptococcus neoformans* e *Microsporum canis*. Os experimentos foram realizados pelo método de difusão em ágar sólido em duplicata e os resultados pelas médias dos halos de inibição. O controle negativo foi obtido pelo micro-organismo semeado na placa sem antimicrobiano e o positivo por meio de substâncias padrão, como tetraciclina (30 µg/mL) para as bactérias e cetoconazol (200 µg/mL) para os fungos. Nenhuma das substâncias testadas mostrou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados.

Silveira *et al.* (2005) realizaram um estudo químico e farmacológico dos frutos da *Syagrus oleraceae* (Martius) Beccari e *Mauritia vinifera* Martius, conhecidas popularmente como guabiroba e buruti. Avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos (100 µg/mL) contra cepas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli*. Os inóculos foram preparados a uma suspensão de 10^6 a 10^7 UFC/mL. Os únicos resultados antimicrobianos contra *E. faecalis* foram observados no extrato etanólico do epicarpo/mesocarpo dos frutos de *S. oleracea*, de suas partições em acetato de etila e do extrato etanólico do epicarpo/mesocarpo dos frutos de *M. vinifera*. Os autores concluíram que os extratos dos frutos de ambas as espécies não foram capazes de inibir significativamente *E. faecalis*.

Reis (2006) avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn (abacateiro, Lauraceae) contra cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. rhizophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella flexneri*, *Candida Krusei*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *Salmonella* sp., partindo de uma suspensão inicial de 0,5 McFarland para as bactérias e 1 McFarland para as leveduras. Utilizou-se as concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL de extrato usando o método de difusão em ágar pela técnica dos poços de 6 mm, aos quais foram adicionados 40 µL de cada concentração. *E. faecalis* não foi sensibilizada pelas concentrações utilizadas nos dois métodos utilizados (disco difusão em ágar e técnica do poço em camada dupla em disco

difusão em ágar), mas ocorreu inibição do crescimento da mesma no ensaio de microdiluição em caldo à concentração de 100 µg/mL. O autor concluiu que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – abacateiro – Lauraceae possui atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, necessitando de complementação dos estudos.

As atividades antimicrobiana e citotóxica de diversos extratos de plantas vem sendo objeto de estudo nos últimos anos. Segundo Stefanello (2006), as propriedades antimicrobianas dos extratos das folhas de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* apresentaram fraca atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, enquanto o extrato das cascas inibiu o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Foram utilizados inóculos a 5×10^6 UFC/mL, pelo método de disco difusão em ágar, na técnica do poço em camada dupla. *E. faecalis* apresentou maior halo de inibição (12 mm) quando testado o extrato em diclorometano, sete mm quando testado o extrato etanólico das cascas e sete mm quando testados os extratos diclorometânicos dos ramos. Os autores concluíram que *G. polymorpha* ssp. *floccosa* não é tóxica devido à resposta antimicrobiana apresentada pelas cascas contra bactérias Gram-positivas.

Souza e Wiest (2007) identificaram e compararam a atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) coletada na cidade de Eldorado do Sul, Rio grande do Sul, contra *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Pasteurella multocida* e *Escherichia coli*. As amostras de extrato hidroalcoólico, alcoólico e decocção, obtidas conforme a Farmacopéia Brasileira (1959), foram testadas em todas as concentrações bacterianas de 10^2 a 10^8 UFC/mL. *E. faecalis* não foi sensibilizada pelo extrato hidroalcoólico da planta seca e por decocto, mas apresentou o segundo melhor resultado de inibição na presença de extrato alcoólico de planta fresca, quando comparado aos demais resultados encontrados. Ainda assim, os resultados foram melhores do que aqueles referentes à ação antimicrobiana contra *Rhodococcus equi* e *Pasteurella multocida*. Estes resultados reforçam a indicação popular do uso da erva-santa para tratar pneumonias e outros quadros de infecção respiratória, uma vez que as duas bactérias sensibilizadas foram isoladas de patologias pulmonares de suínos.

Malinowski *et al.* (2007), em sua pesquisa, propuseram-se a avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica dos principais compostos hidrossolúveis e hidroalcoolsolúveis das folhas de *Artemisia vulgaris*, bem como averiguar os metabólitos secundários, o teor de carboidrato e das proteínas presentes. A planta foi coletada de Curitiba, Paraná e, foram obtidos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas. Os inóculos foram utilizados a 0,5 McFarland para os testes de atividade antimicrobiana e a suspensão de 5×10^5 UFC/mL para avaliar a atividade antifúngica. As cepas utilizadas foram *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*. Neste estudo, nenhum micro-organismo foi inativado independente da concentração de extrato utilizada, sabe-se que, na metodologia empregada, *Artemisia vulgaris* não age na *E. faecalis*.

Os estudos que acercam *Enterococcus faecalis* são desafiantes, uma vez que este micro-organismo apresenta importante papel na patologia humana, especialmente na bucal. Quando ocorre um desequilíbrio na microbiota bucal residente, há lesão de cárie, infecções periodontais e infecções endodônticas e conseqüentemente elevada proliferação de espécies potencialmente patogênicas (MAYER 2004).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas coletadas na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica brasileiras contra *Enterococcus faecalis*.

3.2 Objetivo específico

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos ativos.

Obtenção dos resíduos dos extratos e avaliação da capacidade antimicrobiana dos mesmos.

Obtenção de um perfil cromatográfico dos extratos e resíduos ativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Cepa e Soluções:

- Cepa Bacteriana: American Type Culture Collection (ATCC) *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212
- Digluconato de clorexidina 2%, fabricado pela Biodinâmica®, Paraná, Brasil;
- Digluconato de clorexidina 20%, manipulado pela farmácia de manipulação Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil;

- Hipoclorito de Sódio 10%, manipulado pela farmácia de manipulação Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil;
- Hipoclorito de Sódio 1%, fabricado pela Asfer®, São Paulo, Brasil.

4.2 Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Extração da Universidade Paulista – UNIP, utilizando extratos vegetais coletados na Amazônia e Mata Atlântica por uma equipe especializada composta por botânicos, farmacêuticos, médicos e mateiros conhecedores da região. As coletas foram feitas somente com as devidas licenças, tanto de coleta como de acesso ao patrimônio genético exigido pela legislação brasileira, obtidas junto ao IBAMA – Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e ao CGen – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. A UNIP um barco tripulado, que permanece às margens do Rio Negro, na Amazônia (Figura 7).



Figura 7. Barco da Universidade Paulista - UNIP
Foto: Wilson Malavazi (UNIP)

4.2.1 Coleta de plantas

Diferentes partes de cada espécie de plantas selecionadas foram coletadas na floresta Amazônica e Mata Atlântica, segundo a disponibilidade. Foram acondicionadas em sacos de algodão e enviadas para o Laboratório de Extração da Universidade Paulista – UNIP, em São Paulo (Figura 8). O material foi limpo, de modo que os insetos ou outros animais fossem retirados, bem como parte de outras plantas, areia, terra, entre outros. O material foi seco em estufa de circulação de ar a 40 °C e posteriormente moído em moinho de martelo Holmes®. Após estar completamente moído, o material foi acondicionado em sacos plásticos, selados, identificados e mantidos em câmara fria a -20°C, até a preparação dos extratos (Figura 9). Uma amostra (exsicata) do material coletado para a pesquisa é depositada no Herbário da UNIP para que a identificação botânica (Figura 10 A, B) seja feita posteriormente (YOUNES *et al* 2007).



Figura 8. Sacos de algodão contendo órgãos vegetais coletados na floresta, devidamente identificados.



Figura 9. Amostra dos órgãos vegetais moídos e armazenados em sacos plásticos, selados, identificados e mantidos em câmara fria a -20°C .



A



B

Figura 10. A - Amostra representativa do material a ser moído, armazenado para fins de consulta posterior. B - esecita usada para fazer a identificação da família, gênero e espécie de cada amostra.

4.2.2 Preparação e obtenção dos extratos vegetais

O processo de maceração foi utilizado para obter os extratos. O material moído é colocado em percoladores de vidro Kontes® (Figura 11 A,B) e a mistura de solventes composta por diclorometano e metanol (Merck®), na proporção de 1:1, é colocada de modo a se cobrir todo o pó de planta. O conjunto pó-mistura de solventes é mantido em contato por 24 h. O solvente é removido por evaporação rotativa Buchii® (Figura 12) e o extrato seco foi armazenado em *freezer* Revco® a -20°C. Em seguida, uma quantidade de água é acrescentada ao pó e uma nova maceração é feita por mais 24h. O extrato aquoso é liofilizado (Figura 13) e armazenado no *freezer*. Foram obtidos, portanto, dois extratos com o mesmo material vegetal: um extrato orgânico e um extrato aquoso (Figura 14), que são devidamente identificados de modo a não se relacionar dados botânicos na etiqueta. Os extratos aquosos são representados por números pares e os orgânicos por ímpares.



Figura 11. Processo de extração para obtenção dos extratos vegetais por maceração. A, B - percoladores de vidro.



Figura 12. Aparelho rotoevaporador utilizado para remover os solventes orgânicos dos extratos.



Figura 13. Aparelho utilizado para obtenção dos extratos aquosos liofilizados.



Figura 14. A - orgânico e B – aquoso; extratos acondicionados em frascos de vidro âmbar com tampa de teflon devidamente identificado.

4.2.3 Pesagem dos extratos vegetais

Após os resultados dos estudos de triagem de extratos de plantas brasileiras da Floresta Amazônica e Mata Atlântica contra *Enterococcus faecalis* (SUFFREDINI *et al.* 2004, SUFFREDINI *et al.* 2006a, SUFFREDINI *et al.* 2006b), foram pesados os 25 extratos vegetais ativos selecionados em balança analítica Ohaus® (Figura 15). Cem mg de cada extrato foram pesados diretamente em frascos de criogenia Eppendorf® estéreis de 2 mL, devidamente identificados com etiqueta contendo número de identificação de cada extrato, valor tarado do frasco e quantidade de massa de extrato que foi pesado. Foram armazenados em *freezer* a -20°C até o uso (Figura 16). Os extratos foram adicionados ao interior dos frascos com auxílio de espátula de metal.

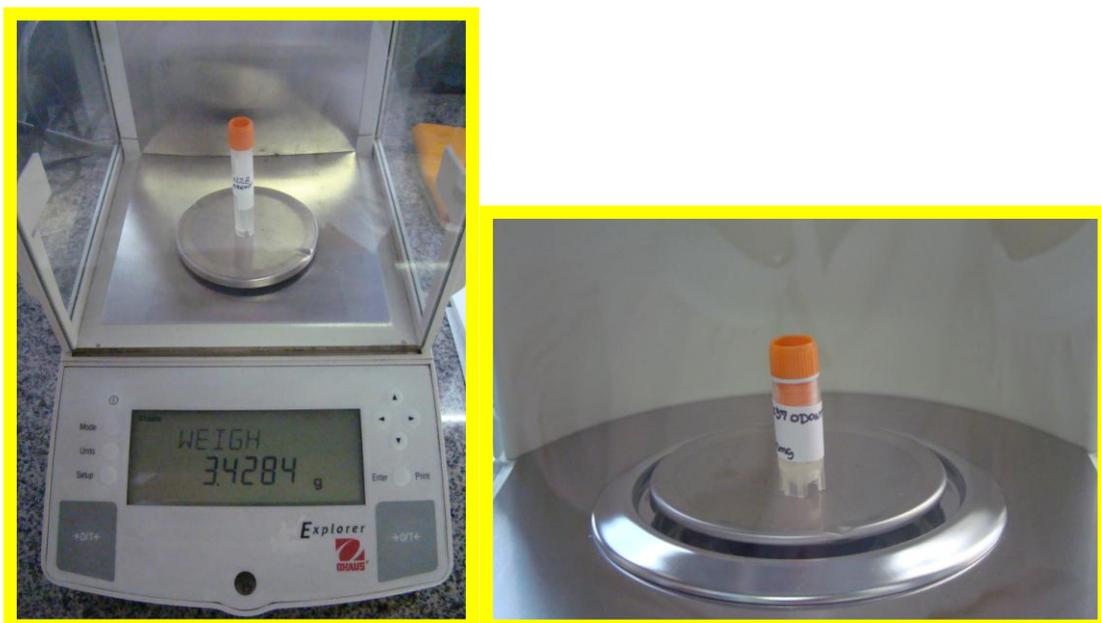


Figura 15. Balança analítica utilizada para pesagem dos 25 extratos e seus resíduos.



Figura 16. Os extratos vegetais foram identificados e armazenados a - 20°C, em câmara fria.

4.2.4 Preparação das amostras de extratos vegetais e substâncias padrão

Os extratos orgânicos foram diluídos em dimetil sulfóxido 50% (DMSO Merck® 50%) em solução aquosa, à concentração de 200 mg/mL. Os extratos aquosos foram preparados na mesma concentração, porém diluídos em água destilada, grau Milli-Q (Millipore®). Os solventes foram adicionados através de micropipeta Eppendorf® 1000 µL e ponteiros estéreis Gilson® compatíveis ao volume. Após a adição dos respectivos solventes, cada frasco foi agitado no Vórtex Thermolyne® por 1 minuto a fim de homogeneizar o conteúdo (Figura 17).



Figura 17. Vórtex usado para homogeneizar os extratos diluídos.

As substâncias padrão foram preparadas em diversas concentrações usuais na prática Odontológica como solução de clorexidina 0,12% e 2% (comercializado) e 20% (manipulado) e hipoclorito de sódio 1% (comercializado) e hipoclorito de sódio 10% (manipulado) (Figura 18 – A,B,C,D). As diluições foram feitas com água destilada grau Milli-Q (Millipore®), Resultando nas concentrações finais de 0,12%, 1% e 2% de solução de clorexidina e 0,5 e 1% de hipoclorito de sódio.



Figura 18. A - hipoclorito de sódio Fórmula e Ação 10% (manipulado), B - hipoclorito de sódio 1% Asfer® (comercializado), C - solução de clorexidina 2% Biodinâmica® (comercializado) e D - solução de clorexidina 20% Fórmula e Ação (manipulado).

Os extratos ativos foram preparados em diferentes concentrações para a obtenção da concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima – CBM. As concentrações testadas foram de 250, 200, 150, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,6 e 0,8 mg/mL, preparadas em água destilada grau Milli-Q (Millipore®) ou dimetil sulfóxido 50% em água.

Todas as soluções preparadas e testadas no ensaio da microdiluição em caldo – MDC foram diluídas 20 vezes na realização do experimento e as concentrações descritas acima foram, portanto, divididas por 20, sendo

consideradas no poço, 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08 e 0,04 mg/mL.

4.2.5 Meios de cultura

4.2.5.1 Müller Hinton Ágar (MHA)

O meio de cultura Ágar Müller Hinton - MHA (Oxoid®, Inglaterra) foi utilizado para preparar as placas de petri e testar a susceptibilidade antimicrobiana. O quadro 1 descreve os constituintes do MHA.

Formulação	g/L
Infusão desidratada de carne	300,0
Hidrolisado de caseína	17,5
Amido	1,5
Ágar	17,0

Quadro 1. Composição do meio Müller Hinton ágar utilizado para preparar as placas de Petri.

O fabricante orienta utilizar uma proporção de 38 g para 1 L de água destilada, grau Milli-Q (Millipore®). A suspensão foi preparada em frasco de vidro com tampa (Kimax®) após pesar o pó do MHA e adicionar a solução, deixando dissolver completamente os constituintes e esterilizando em autoclave a 121°C por 15 minutos (Figura 19). Quando o preparado estéril atingiu a temperatura de 56°C, o mesmo foi levado para o fluxo laminar vertical Veco® e com auxílio do pipetador automático (Eppendorf®) e pipetas de 50 mL estéreis descartáveis (Corning®) foram adicionados 15 mL de meio em cada placa de Petri plástica 90x15 lisa Pleion® (Figura 20). Após o processo de geleificação do meio, as placas foram identificadas, datadas e armazenadas na geladeira (Eletrolux®) para uso extemporâneo.



Figura 19. Meio de cultura Müeller Hinton ágar e meio de cultura Müeller Hinton caldo (Oxoid®, Inglaterra).



Figura 20. Placas de Petri com meio de cultura Müeller Hinton ágar, no fluxo laminar vertical (Veco®).

4.2.5.2 Müller Hinton Caldo (MHC)

O meio de cultura Müller Hinton Caldo - MHC (Oxoid®, Inglaterra) foi utilizado para os ensaios antimicrobianos. O quadro 2 descreve os constituintes do MHC.

Formulação	g/L
Infusão desidratada de carne	300,0
Hidrolisado de caseína	17,5
Amido	1,5

Quadro 2. Composição do meio Müller Hinton Caldo utilizado.

O fabricante orienta utilizar uma proporção de 21 g para 1 L de água destilada, grau Milli-Q (Millipore®). O conteúdo foi preparado em frasco de vidro com tampa, após pesar o pó do MHC e adicionar a água. O meio é dissolvido e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos (Figura 21). Quando o preparado estéril atingiu a temperatura ambiente, o mesmo foi levado para o fluxo laminar vertical Veco® para que o experimento fosse realizado em meio caldo.



Figura 21. Autoclave (Fanem®).

4.2.6 Cepa bacteriana

A cepa bacteriana padrão utilizada *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) código 29212 é originada da American Type Culture Collection - ATCC®, Estados Unidos (Figura 22). As cepas foram adquiridas liofilizadas, em alças de plástico descartáveis, e apresentam-se acondicionadas em envelopes (Loops®, Remel®) que por sua vez estão acondicionadas em caixa apropriada, mantida sob refrigeração até o uso.



Figura 22. Cepas bacterianas padrão utilizadas *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) código 29212, é originada da American Type Culture Collection - ATCC®, Estados Unidos.

A reativação da bactéria ocorreu imediatamente após a abertura do envelope protetor, e a alça com o conteúdo bacteriano foi estriada por técnica de esgotamento na placa de Petri contendo MHA, sob condições estéreis (Figura 23 A, B). Esta placa foi denominada “placa mãe”, e foi incubada em estufa de cultura Fanem® a 37°C por 18 a 24 horas. Após o crescimento por 24 h, a placa pode ser mantida em geladeira e ser usada por até 30 dias. O líofilo adquirido encontra-se na 2ª passagem, sendo que foi estabelecida a 3ª passagem para todos os experimentos.

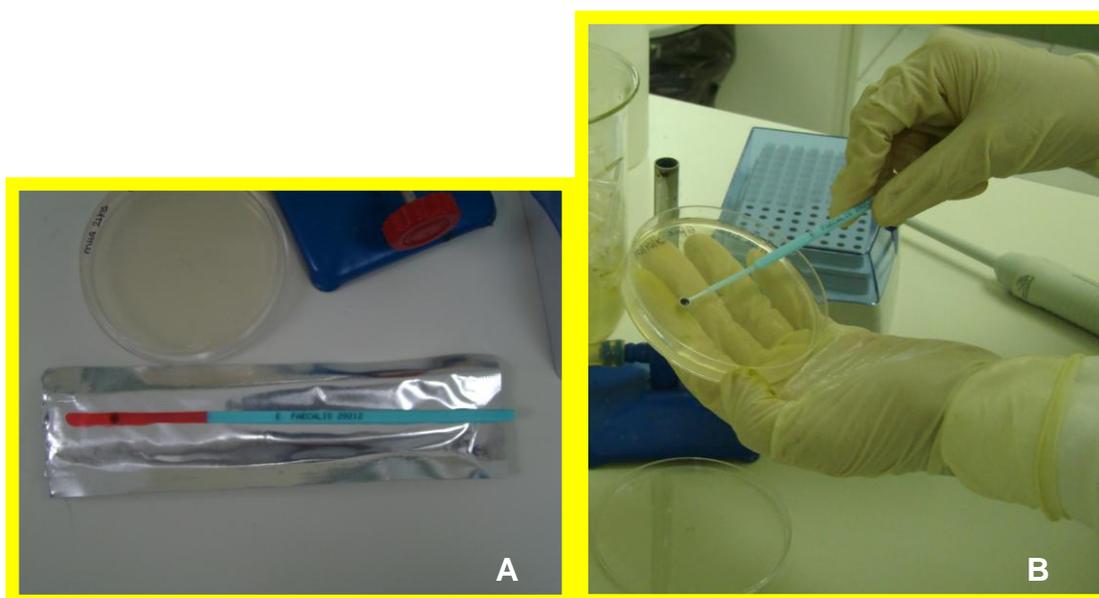


Figura 23. A – Envelope contendo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC® 29212, B – Reativação na placa Müller Hinton ágar.

Testes de Gram e de catalase foram periodicamente realizados com a cepa a fim de acompanhamento.

4.2.6.1 Coloração de gram

O teste de Gram foi realizado para proporcionar a visualização das características bacterianas correspondentes a *E. faecalis*. Basicamente, este teste consiste em esfregar uma pequena porção de bactéria *E. faecalis* na lâmina de vidro, fixar o esfregaço da lâmina passando-a do lado oposto ao esfregaço três vezes sobre a chama do bico de Bunsen e esperar esfriar, para posteriormente seguir as etapas da técnica. Primeiramente, pingar algumas gotas de cristal violeta sobre o esfregaço na lâmina de vidro, lavar rapidamente com água destilada, grau Milli-Q (Millipore®), em seguida, pingar algumas gotas de lugol sobre o mesmo local deixando agir por 1 minuto, lavar novamente com água e descorar suavemente com álcool absoluto, por 15 segundos. Esta etapa diferencia o grupo bacteriano em Gram-positivo e Gram-negativo, pois no caso da *E. faecalis* (Gram-positiva facultativa) o álcool não remove o conjunto cristal violeta e lugol, permitindo que as bactérias fiquem coradas pelo corante, pois a camada peptidoglicano, característica das Gram-positivas, é espessa e rica de substâncias que impedem a penetração do álcool. Na lâmina, a *E. faecalis* apresentou coloração roxo escuro compatível à classe.

4.2.6.2 Teste da catalase

O teste de catalase é outro método que distingue estafilococo de estreptococo. A técnica consiste em realizar um esfregaço de cultura bacteriana fresca, no tempo de crescimento de 18 a 24 horas, na lâmina de vidro para microscopia e pingar duas gotas de peróxido de hidrogênio sobre *E. faecalis*. O resultado negativo revela a ausência da catalase, uma vez que a mesma promove a lise do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, gerando a liberação de bolhas de

oxigênio, fato não visualizado neste caso, comprovando a identificação de catalase negativa, característica de *Enterococcus*.

4.2.7 Preparo da cultura bacteriana fresca

A partir da “placa mãe” (2ª passagem), foi realizada uma nova passagem da bactéria, de modo que a cultura fresca ficasse na 3ª passagem (Figura 24). A técnica utilizada na placa para estriar a *E. faecalis* foi de esgotamento. A placa foi levada à estufa à temperatura de 37°C, por 18 a 24 horas. Este procedimento foi repetido em toda a sequência do estudo.

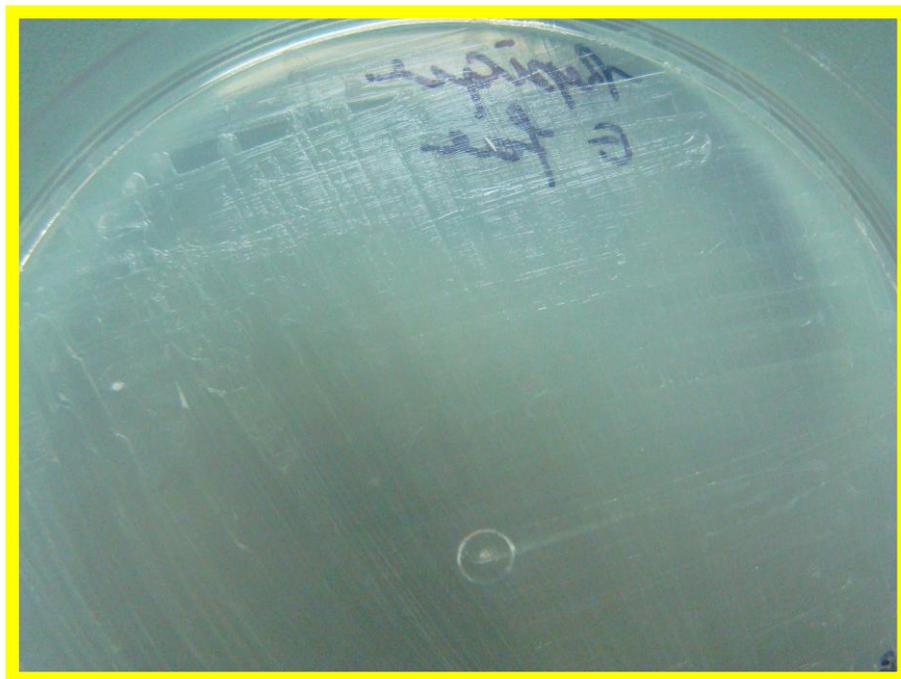


Figura 24. Colônias *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC® 29212 na 3ª passagem para todos os experimentos.

4.2.8 Preparo da suspensão bacteriana para os ensaios antimicrobianos em disco difusão em ágar

Decorridas às 24 horas de crescimento bacteriano, na 3^a passagem, iniciou-se o preparo das suspensões bacterianas. O experimento foi realizado sobre a bancada na presença do bico de Bunsen. Foram utilizados tubos de ensaio estéreis com tampa para acondicionar 9 mL de soro fisiológico estéril (Figura 25), transferidos com auxílio de pipetador automático Eppendorf® e pipetas de vidro estéreis de 10mL (Laborglas®). A partir de uma alçada de colônias de *E. faecalis* da placa de Petri, transferiu-se a massa bacteriana para o tubo. A suspensão foi homogenizada no Vórtex Thermolyne® por 1 minuto, até atingir a escala de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), no turbidímetro Oxoid®, com solução de sulfato de bário em concentrações correspondentes à turbidez desejada (Figura 26).



Figura 25. Bateria de tubos de ensaio preparada para a diluição da suspensão bacteriana.



Figura 26. Padronização da suspensão bacteriana utilizando turbidímetro Oxoid®.

4.2.8.1 Disco difusão em Ágar - DDA

A suspensão bacteriana preparada a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi usada para inocular as placas de meio MHA. Sobre a bancada, na presença do bico de Bunsen, cada placa foi inoculada com auxílio de *swab* estéril pela técnica do esgotamento. As placas de Petri inoculadas foram identificadas com caneta Sharpy®. Na identificação, constavam a data de confecção do meio, a data do experimento e o número do extrato. Foram adicionados 6 discos de papel estéreis por placa. Cada disco recebeu 10 μ L de extrato previamente diluído, com o auxílio de micropipeta de 10 μ L e ponteira correspondente ao volume utilizado. As substâncias padrão foram testadas e volumes correspondentes a 10 μ L foram empregados (Figura 27 A,B).

Foram testados 25 extratos e 13 concentrações diferentes de substâncias padrão. As placas foram colocadas na estufa de cultura Fanem® a 37°C por 18 a 24 horas. Decorrido este tempo, realizou-se a leitura dos halos de inibição. As figuras 28 A,B, 29 A,B, 30 A,B,C,D, 31 A,B e 32, apresentam o ensaio no modelo disco difusão em ágar de dimetil sulfóxido 50% e 100% contra *E. faecalis* e com as substâncias padrão clorexidina e hipoclorito de sódio. Foram utilizados 10 μ L de cada substância no disco de papel estéril. Os halos de inibição foram aferidos,

valendo-se de duas medidas perpendiculares entre si, com paquímetro digital Caliper®, modelo Stainless (Figura 33). O experimento seguiu a metodologia sugerida pelo Committee for Clinical Laboratory Standards - CCLS (antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2000).

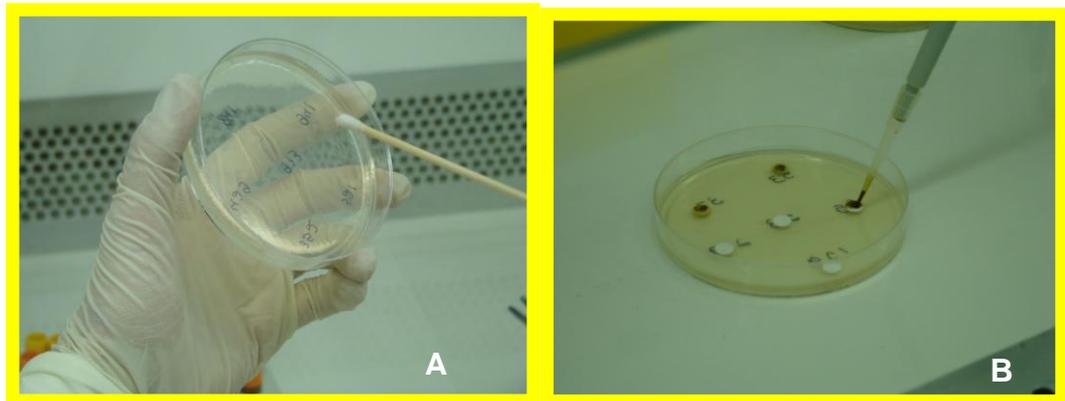


Figura 27. A – Inoculação *Enterococcus faecalis* em Müller Hinton ágar, B – Adição dos extratos nos discos, no modelo de disco difusão em ágar.



Figura 28. A – Halo de inibição do extrato 352 pertencente à família Fabaceae Mimosoideae, gênero e espécie *Stryphnodendron pulcherrimum* contra *Enterococcus faecalis* na placa Müller Hinton ágar, B – Halo de inibição do extrato 841 pertencente a família Myrsinaceae, gênero e espécie *Rapanea parvifolia* contra *Enterococcus faecalis* na placa Müller Hinton ágar.

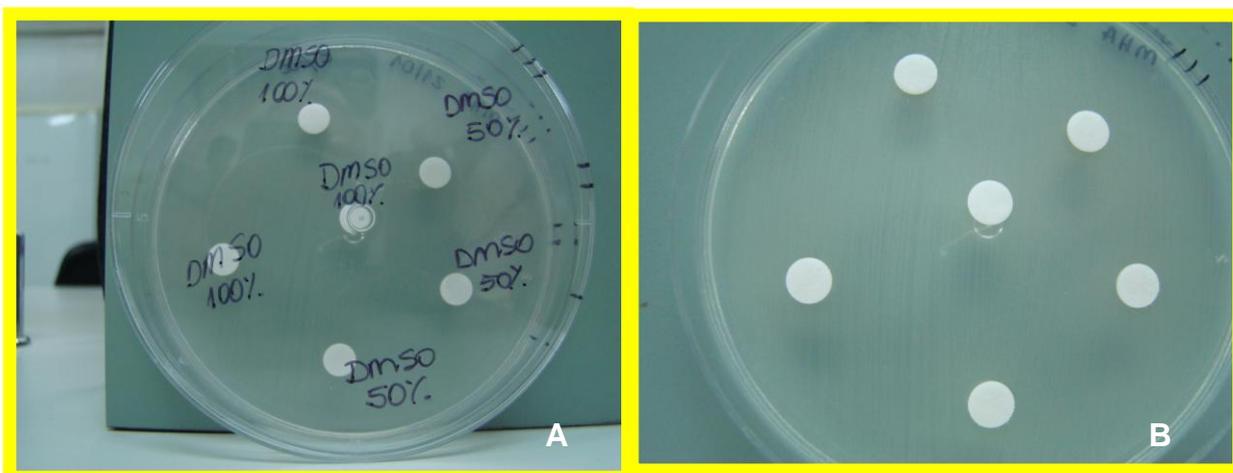


Figura 29. A, B – Resultados visualizados no modelo disco difusão em ágar do dimetil sulfóxido 50% e 100% contra *Enterococcus faecalis*.

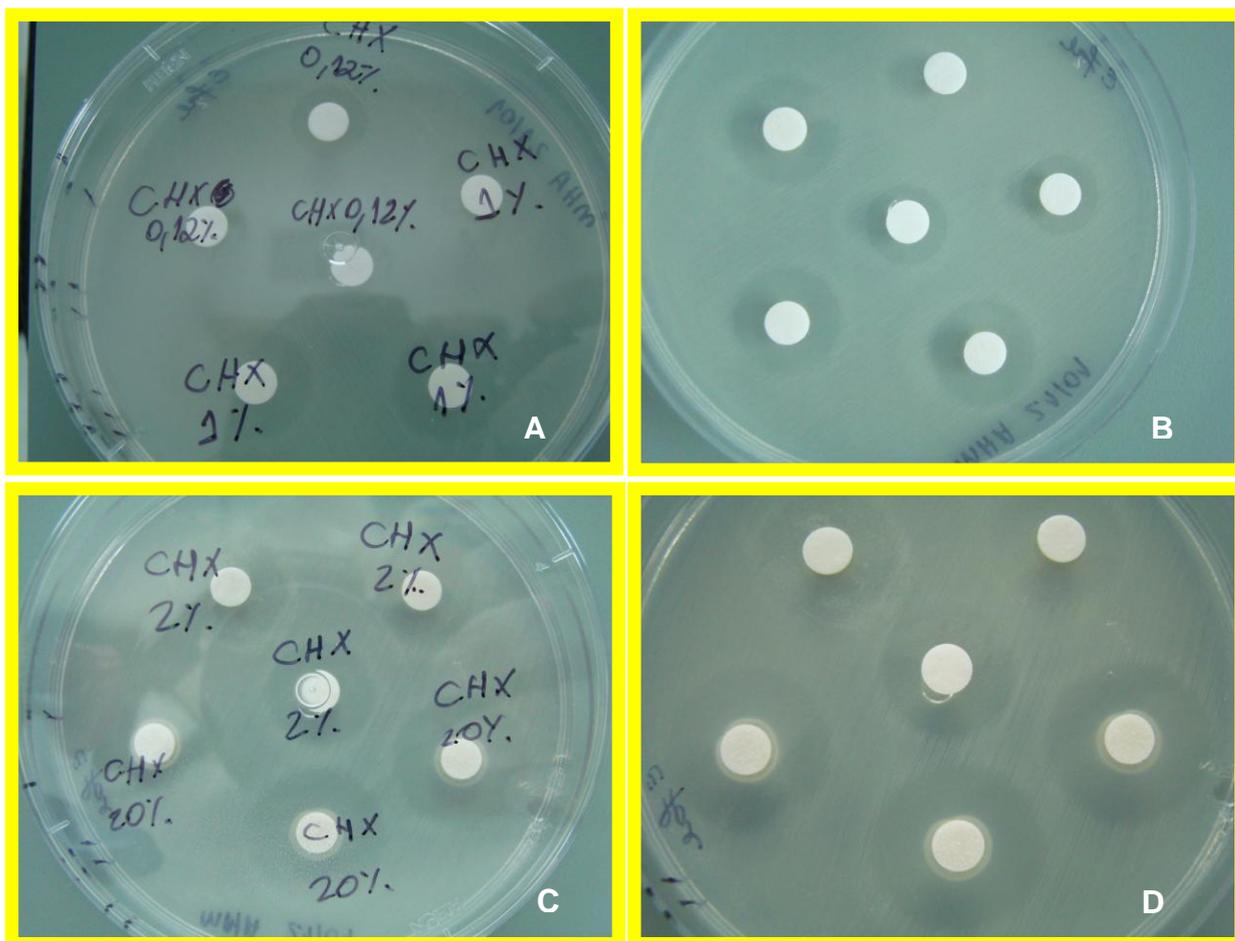


Figura 30. A,B – Resultados visualizados no modelo disco difusão em ágar da clorexidina (manipulada) 0,12% e 1% contra *Enterococcus faecalis*, C,D – Resultados visualizados no modelo disco difusão em ágar da clorexidina (manipulada) 2% e 20% contra *Enterococcus faecalis*.

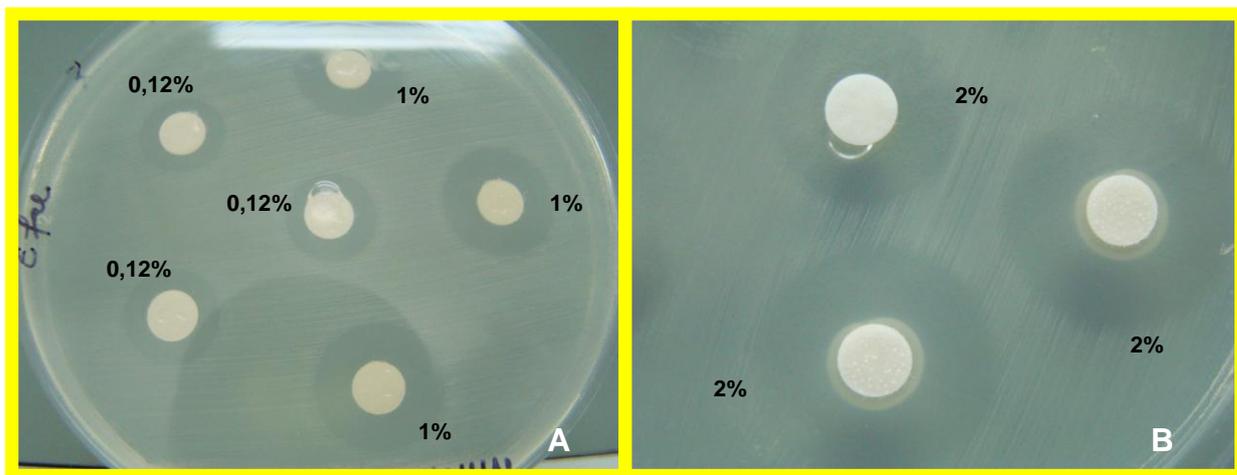


Figura 31. A – Resultados visualizados no modelo disco difusão em ágar da clorexidina (comercializado) 0,12% e 1% contra *Enterococcus faecalis*, B – Resultados visualizados no modelo disco difusão em ágar da clorexidina (comercializada) 2% contra *Enterococcus faecalis*.



Figura 32. Resultados visualizados no modelo disco difusão em ágar do hipoclorito de sódio (manipulado) 0,5% contra *Enterococcus faecalis* e hipoclorito de sódio (comercializado) 1% contra *Enterococcus faecalis*.

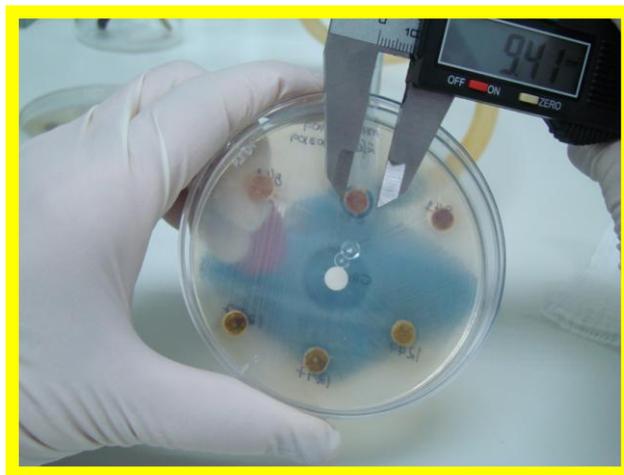


Figura 33. Leitura dos halos de inibição com paquímetro digital, no modelo de disco difusão em ágar com paquímetro digital.

4.2.8.2 Delineamento experimental para o ensaio de disco difusão.

Os extratos vegetais aquosos e orgânicos, preparados a uma concentração de 200 mg/mL, foram submetidos a uma triagem para se averiguar a capacidade inibitória de crescimento bacteriano dos mesmos. Para isso, 10 μ L de cada solução de extratos foram adicionados a um único disco de papel de 6 mm de diâmetro. Os extratos que inibiram o crescimento bacteriano, independentemente do tamanho do halo, foram selecionados. Os extratos selecionados foram submetidos ao mesmo ensaio, para a confirmação da atividade inibitória. Os extratos que tiveram a atividade inibitória confirmada foram testados em triplicata e seus halos foram medidos com paquímetro digital. As médias e desvios padrão relativas a cada extrato foram obtidas e análise de variância aplicada, a fim de se determinar diferenças significantes de inibição de crescimento entre as substâncias e extratos.

4.2.9 Preparo da suspensão bacteriana para os ensaios antimicrobianos de microdiluição em caldo

A partir de uma suspensão de 1 McFarland (3×10^8 UFC/mL), obtida por análise em turbidímetro Oxoid®, realizou-se diluição em série em 6 tubos de ensaio

de vidro com tampa, contendo 9 mL de solução salina, numerados de 1 a 6. Com auxílio de uma pipeta de vidro estéril e um pipetador automático, foi transferido 1 mL da suspensão inicial para o tubo 1. A suspensão foi homogenizada e o processo repetido até o tubo número 6, ilustrado na Figura 34. Realizou-se a contagem bacteriana dos tubos 4, 5 e 6, através da transferência de 0,1 mL das suspensões bacterianas dos tubos correspondentes, para placas de Petri com MHA, em duplicata. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 37°C por 18 a 24 horas e os tubos de vidro com as diluições foram armazenados sob refrigeração por 24 h aguardando a contagem bacteriana para a realização dos experimentos (Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil 1959).

Passadas as 24 horas, as placas de MHA da contagem bacteriana foram retiradas da estufa e realizou-se a contagem bacteriana. Os tubos cuja contagem ficou entre 30 e 300 unidades formadoras de colônia, foram considerados para a contagem da suspensão inicial.

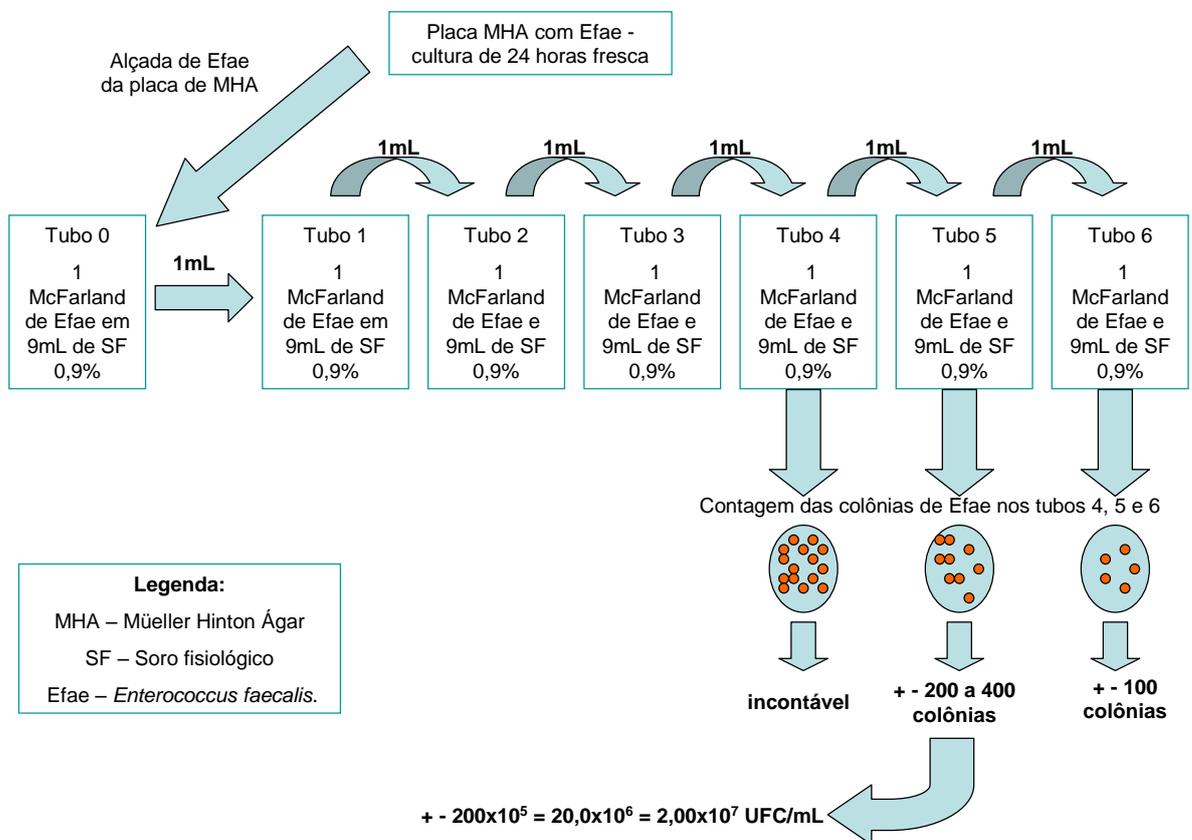


Figura 34. Esquema do método de diluição em série.

4.2.9.1 Microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima - CBM

O método de diluição em caldo descrita pelo NCCLS (2000) foi adaptada para a realização em microplacas (KUBOTA, OHARA, BACCHI 2001). Nesta etapa, todo procedimento foi realizado no fluxo laminar vertical Veco®, seguindo os critérios necessários para procedimentos estéreis (Figura 35).

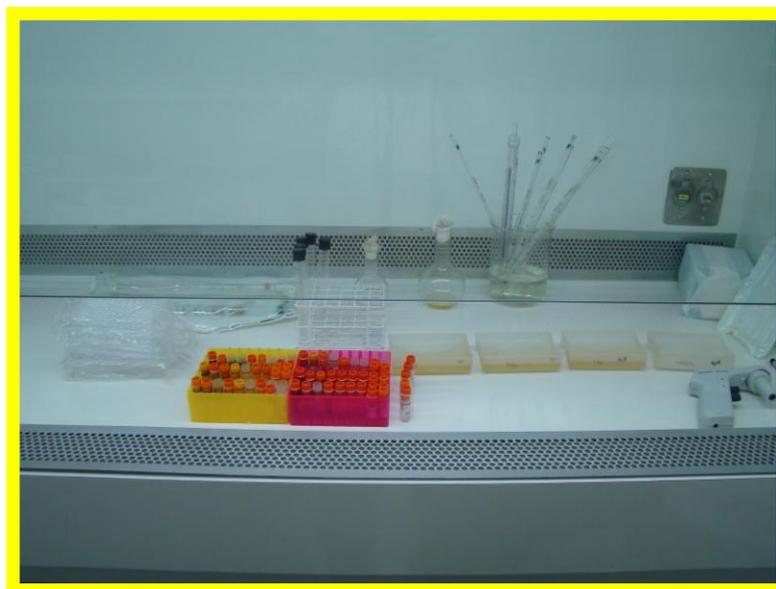


Figura 35. Material para o ensaio da microdiluição em caldo no fluxo laminar vertical Veco®.

Foram adicionados 190 μL de suspensão bacteriana em meio MHC nas microplacas de 96 poços de fundo arredondado com micropipeta multicanal automática (Biohit®). As concentrações das suspensões bacterianas usadas para testar os extratos ativos foram 108, 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , e 1×10^2 UFC/mL (Figura 36). Foram adicionados 10 μL de cada uma das diferentes concentrações de extratos ou substâncias – padrão aos 190 μL de suspensão bacteriana. Cada microplaca apresentou dois poços controle, um para crescimento negativo, que representa a avaliação do processo estéril do experimento e outro, para crescimento positivo, que representa o padrão de crescimento bacteriano sem tratamento.

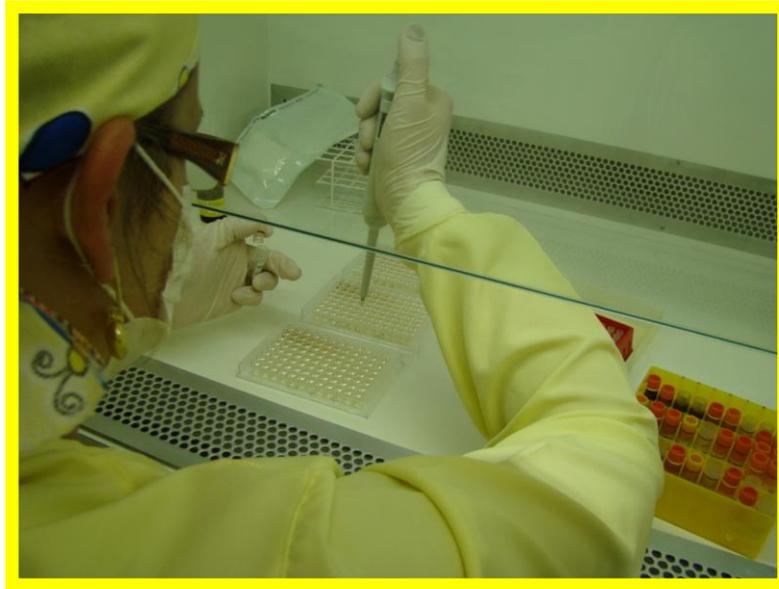


Figura 36. Ensaio de miodiluição em caldo sendo realizado no fluxo laminar (Veco®).

Cada amostra ou substância-padrão foi avaliada em duplicata. As microplacas foram mantidas em estufa de cultura a 37°C, por 18 a 24 horas. Após esse período, a leitura dos resultados foi feita visualmente e foram estabelecidos os seguintes parâmetros: “X” = formação de botão, não houve inibição; “C” = turbidez acrescida de colônias, floculação sem formação de botão; “++” = vários pequenos flocos de colônias, inibição parcial; “+” = poucos flocos de colônias, sem turvação; “L” = meio límpido, provável inibição de crescimento bacteriano (Figura 37 A,B,C).

Todos os resultados avaliados como “L”, ou cuja leitura ficou prejudicada pelo depósito de extrato ou substância padrão, foram submetidos à subcultura em meio MHA (Figura 38). As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. Decorridos o tempo, foi observado se houve ou não crescimento bacteriano. Se houve crescimento bacteriano, classifica-se a atividade biológica como “L+” e se não houve crescimento bacteriano, classifica-se como “L-”. Este experimento foi delineado para a análise e obtenção da CIM e CBM. Para se considerar CIM, observa-se qual foi a menor concentração que apresentou “L+” e considera-se CBM a menor concentração classificada como “L-”.

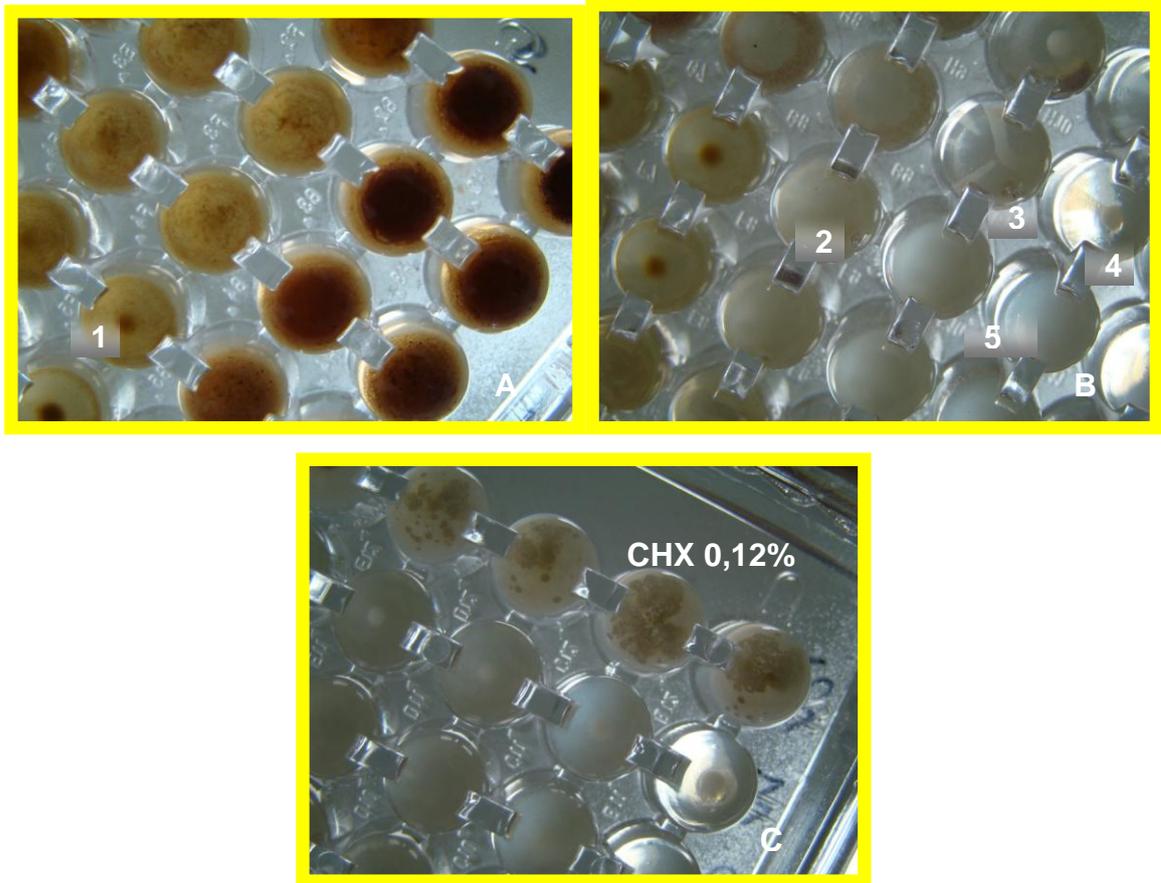


Figura 37. A, B, C – Leitura visual dos resultados pelo modelo de microdiluição em caldo nos poços. 1. “X” = formação de botão, não houve inibição; 2. “C” = turbidez acrescida de colônias, floculação sem formação de botão; 3. “++” = vários pequenos flocos de colônias, inibição parcial; 4. “+” = poucos flocos de colônias, sem turvação; 5. “L” = meio límpido, provável inibição de crescimento bacteriano.

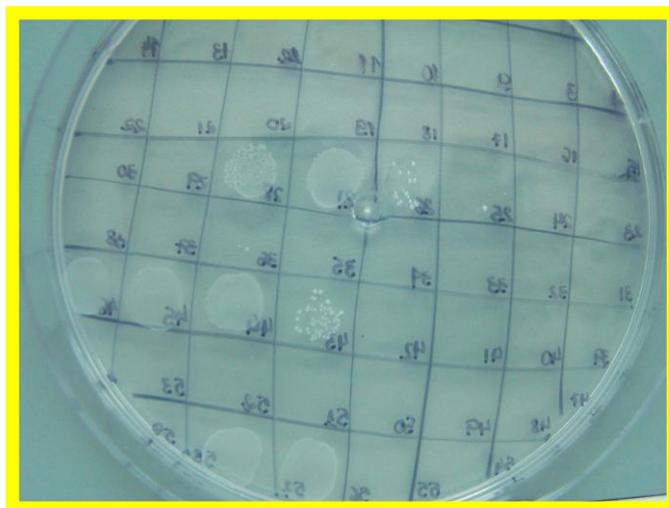


Figura 38. Subcultura em placa de Mueller Hinton ágar de todos os poços.

4.2.10 Partição Líquido – Líquido

A metodologia empregada baseou-se no processo de partição líquido-líquido, utilizando-se três solventes diferentes de maneira a se obter um resíduo apolar, um intermediário e um polar. O resíduo apolar corresponde ao clorofórmico, o resíduo intermediário corresponde ao butanólico e o polar corresponde ao aquoso. Após a completa evaporação dos solventes na capela (resíduos butanólicos, clorofórmicos e aquosos) e no liofilizador (resíduo aquoso), foram obtidos os três resíduos (Figura 39).

Dos 25 extratos vegetais foram obtidos 75 resíduos, sendo que cada um foi transferido para frascos de criogenia de 2 mL, identificados e pesados na balança analítica, a fim de se obter 100 mg de cada resíduo (Figura 40).

Os resíduos aquosos foram ressuspensos em água destilada grau Milli-Q (Millipore®) e os clorofórmicos e butanólicos em dimetil sulfóxido e água grau Milli-Q (Millipore®) até a concentração final de 200 mg/mL. Foram acondicionados em frascos de criogenia de 2 mL. Os frascos foram agitados no vórtex a fim de homogeneizar o resíduo.



Figura 39. Processo de partição líquido-líquido.



Figura 40. Frascos de criogenia de 2 mL contendo 100 mg dos 75 resíduos.

4.2.11 Disco difusão em ágar feito com os resíduos

O ensaio do disco difusão em ágar, preparado tal como nos ensaios feitos com os extratos, foi usado para a avaliação dos resíduos clorofórmicos, butanólicos e aquosos de cada um dos 25 extratos ativos em uma única concentração, de 200 mg/mL, para simples verificação de atividade dos resíduos ativos em unicata com os 75 resíduos obtidos e posteriormente em triplicata, com os que apresentaram atividade (Figura 41).

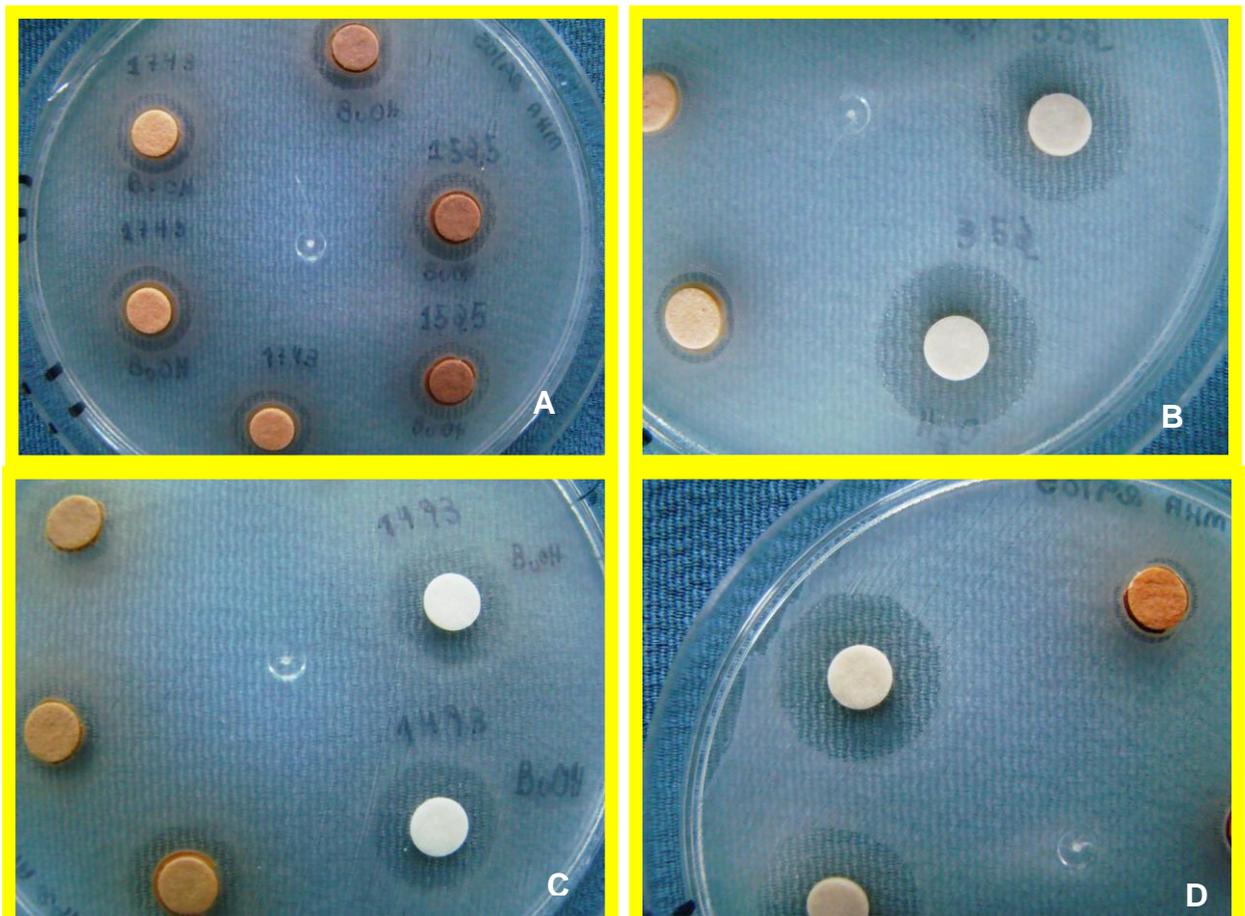


Figura 41. A,B,C,D - Ensaio de disco difusão em ágar com os 75 resíduos, mostrando diferenças nas respostas de inibição em relação a cada amostra.

4.2.12 Microdiluição em caldo - MDC dos resíduos

O ensaio da microdiluição em caldo foi realizado segundo a mesma técnica descrita para as análises feitas com os extratos. Os 75 resíduos foram testados a fim de se verificar suas atividades antibacterianas, e os que apresentaram inibição de crescimento foram submetidos à subcultura em meio Müller Hinton ágar (Figuras 42 A,B,C,D e 43).

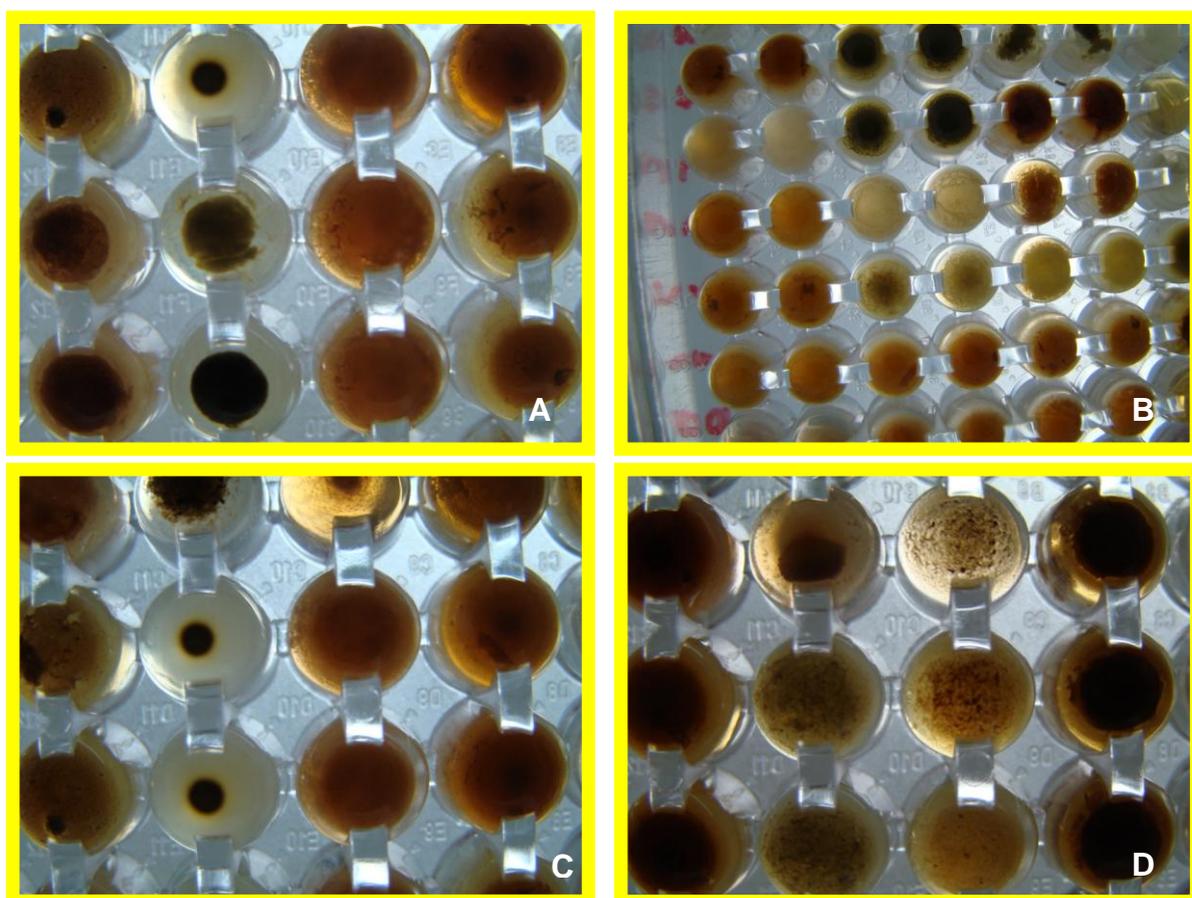


Figura 42. A,B,C,D - Ensaio da microdiluição em caldo com os 75 resíduos.

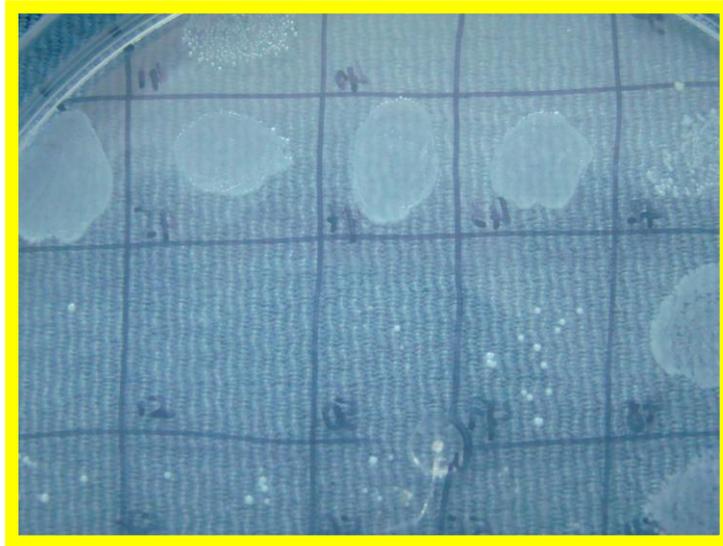


Figura 43. Subcultura do ensaio da microdiluição em caldo com os 75 resíduos em meio Müller Hinton ágar .

4.2.13 Cromatografia

Foi realizada cromatografia em camada delgada para se verificar, em termos qualitativos, a eficácia do fracionamento dos extratos ativos. Para isso, foram utilizadas cromatofolhas com sílica gel GF (Merck®), diferentes fases móveis, foram utilizados os reveladores ácido sulfúrico 25% e luz ultravioleta 254 nm. A análise foi feita através da comparação entre as manchas originadas do extrato bruto e dos resíduos.

As cromatofolhas foram divididas em retângulos de 5 x 2,5 cm (análise de 4 amostras) ou 5 x 3 cm (análise de 5 amostras), nos quais as amostras foram aplicadas na mesma sequência em três cromatofolhas, para análise em três sistemas de solventes diferentes. As amostras analisadas foram o extrato bruto, o resíduo clorofórmico, o resíduo butanólico e o resíduo aquoso, respectivamente (Figura 44 A,B).

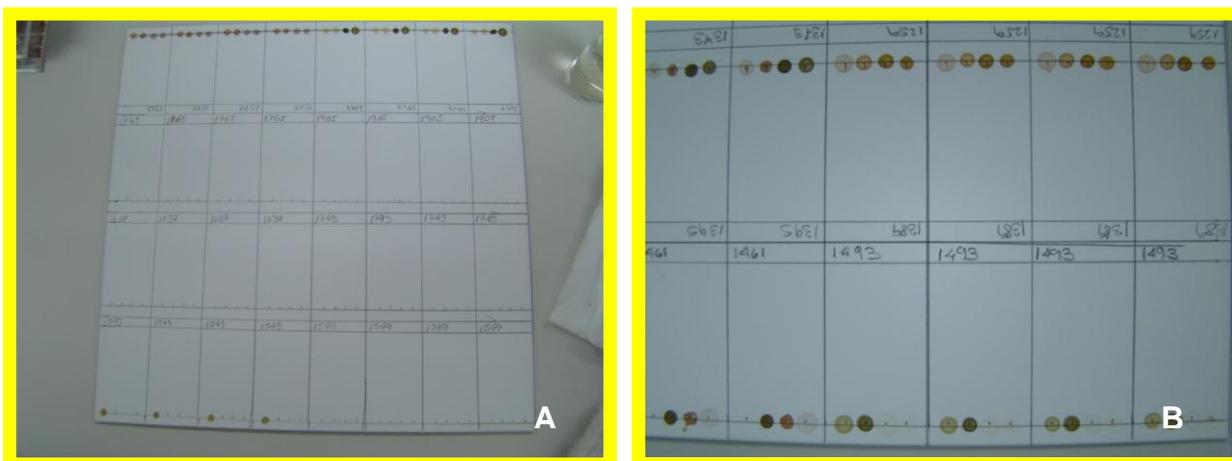


Figura 44. A,B- Cromatofolhas preparadas para análise dos extratos brutos e seus resíduos cloróformicos, butanólicos e aquosos em três misturas de solventes distintas.

Após a aplicação dos extratos e resíduos em cada cromatofolha, estas foram eluídas em béqueres contendo sistemas de solventes que diferem quanto à polaridade, e são compostos por: sistema 1 - hexano e acetato de etila (4:1) aplicado nas cromatofolhas 1; sistema 2 – clorofórmio e acetato de etila (1:1) aplicado nas cromatofolhas 2 e sistema 3 –clorofórmio, acetato de etila e metanol (2:2:1) aplicado nas cromatofolhas 3 (Figura 45 A,B).

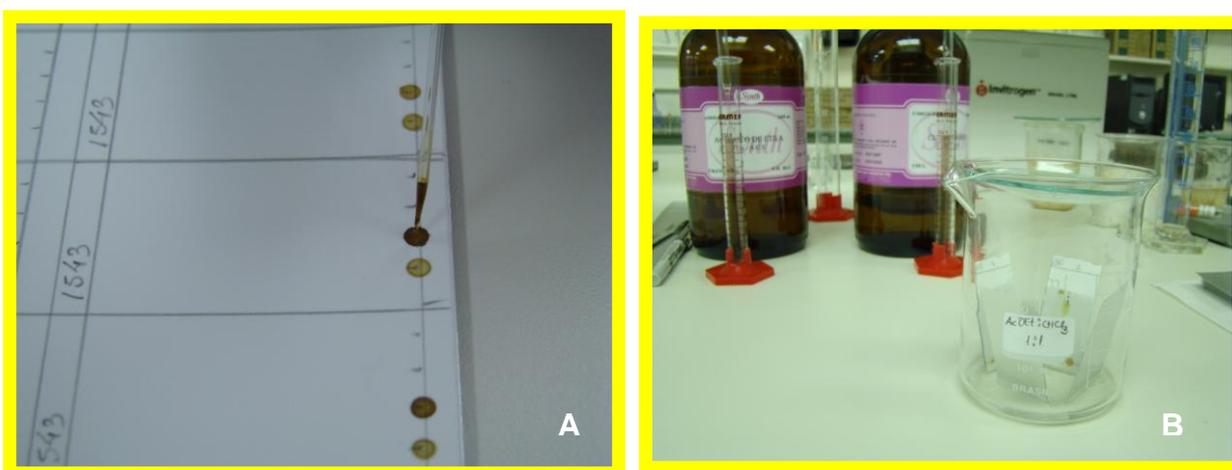


Figura 45. A - Adição das amostras nas cromatofolhas, B - desenvolvimento em Becker contendo os sistemas de solventes.

Os cromatogramas foram primeiramente observados sob luz ultravioleta no comprimento de onda 254 nm (Figura 46).



Figura 46. Manchas observadas sob luz ultravioleta.

Na capela, os cromatogramas foram revelados com o reagente ácido sulfúrico 25% seguido de aquecimento em chapa (HotLab®), à temperatura entre 100° e 110°C (Figura 47 A,B).

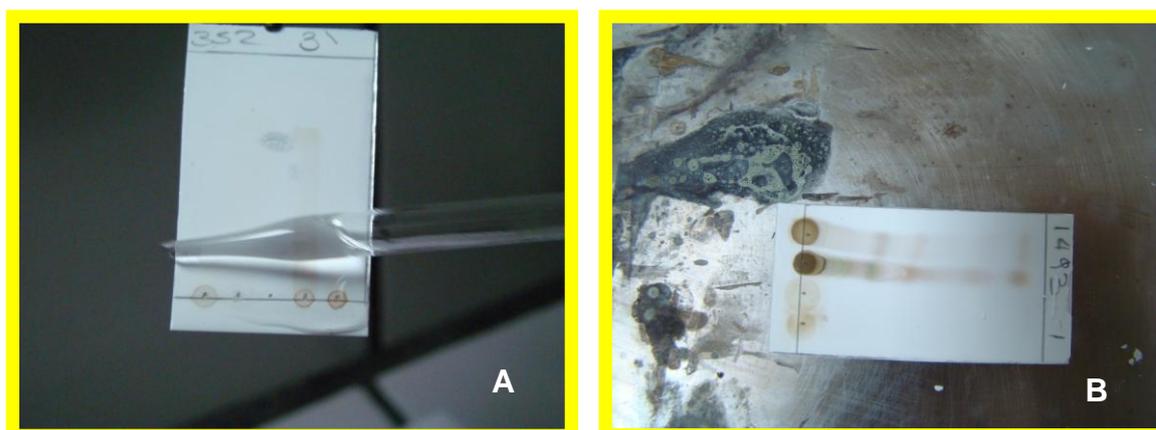


Figura 47. A – ácido sulfúrico 25% adicionado ao cromatograma; B – Revelação na chapa de aquecimento.

4.2.14 Teste de potencial atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante nas cromatofolhas foi realizada através do método do β -caroteno descrito por PRATT, MILLER (1984). A solução de β -caroteno foi preparada da seguinte maneira. Nove mg de β -caroteno foram dissolvidos em 30 mL de clorofórmio. Duas gotas de ácido linoléico foram adicionados a 60 mL de etanol. Estas duas soluções foram reunidas e utilizadas para revelação das amostras na cromatofolha. Os cromatogramas foram deixados à exposição de luz por duas horas.

5 RESULTADOS

Os resultados antimicrobianos encontrados pelo método DDA e MDC estão descritos nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Os ensaios realizados com DMSO – dimetil sulfóxido nas concentrações de 50% e 100% não apresentaram inibição bacteriana, confirmando a eleição do uso como diluente universal. O inóculo bacteriano de *E. faecalis* foi preparado a 0,5 McFarland para os ensaios de disco difusão em ágar e 1 McFarland para os ensaios de microdiluição em caldo. A Tabela 8 expressa os resultados obtidos da CIM e CBM dos extratos.

Tabela 4. Resultados dos 25 extratos que apresentaram atividade antimicrobiana. Número, órgão, família, gênero e espécie dos extratos.

Extrato	N° Coletor	Órgão	Família	Gênero	Espécie	Autor
55	PSC 396	Folhas	Fabaceae	<i>Macrolobium</i>	<i>multijugum</i>	(DC.)Benth.
321	PSC 414	Folhas e flores	Caesalpinoideae Myrtaceae	<i>Psidium</i>	<i>densicomum</i>	DC.
352	IBS 9	Caule	Fabaceae Mimosoideae	<i>Stryphnodendron</i>	<i>pulcherrimum</i>	Hochr.
429	PSC 144	Caule	Proteaceae	<i>Roupala</i>	sp.	
841	AAO 3458	Órgãos aéreos	Myrsinaceae	<i>Rapanea</i>	<i>parvifolia</i>	(A.DC.) Mez
1247	IBS 53	Órgãos aéreos	Myrtaceae	<i>Psidium</i>	<i>densicomum</i>	DC.
1257	AAO 3717	Órgãos aéreos	Rubiaceae	<i>Palicourea</i>	<i>guianensis</i>	Aubl.
1259	IBS 56	Órgãos aéreos	Piperaceae	<i>Piper</i>	sp.	
1298	AAO 3721	Caule	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	<i>myriantha</i>	(Meisn.) Mez
1373	IBS 110	Folhas	Clusiaceae	<i>Garcinia</i>	cf. <i>macrophylla</i>	Mart.
1389	IBS 142	Caule	Clusiaceae	<i>Moronobea</i>	<i>coccinea</i>	Aubl.
1395	IBS 143	Folhas	Fabaceae	<i>Hymenaea</i>	<i>parvifolia</i>	Benth.
1461	AAO 4015	Órgãos aéreos	Caesalpinoideae Sapindaceae	<i>Paullinia</i>	cf. <i>alata</i>	(Ruiz & Pav.)G.Don
1493	AAO 4031	Órgãos aéreos	Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i>	sp.	
1497	IBS 164	Órgãos aéreos	Moraceae	<i>Sorocea</i>	<i>duckei</i>	W.Burg
1525	IBS 63	Caule	Connaraceae	<i>Connarus</i>	<i>ruber</i> var. <i>ruber</i>	(Poepp.) Planch.
1543	AAO 3711	Órgãos aéreos	Clusiaceae	<i>Tovomita</i>	<i>longifolia</i>	(Rich.)Hochr.
1549	AAO 4027	Órgãos aéreos	Combretaceae	<i>Combretum</i>	<i>rotundifolium</i>	Rich.
1637	AAO 4120	Órgãos aéreos	Annonaceae	<i>Diclinanona</i>	<i>calycina</i>	Benoist
1743	IBS 204	Órgãos aéreos	Connaraceae	<i>Connarus</i>	cf. <i>ruber</i> var. <i>sprucei</i>	(Poepp.) Planch. var. <i>sprucei</i> (Baker) Forero
1765	IBS 142	Flores	Clusiaceae	<i>Moronobea</i>	<i>coccinea</i>	Aubl.
1905	AAO 4148	Caule	Clusiaceae	<i>Simphonia</i>	<i>globulifera</i>	L.
1923	AAO 4029	Órgãos aéreos	Fabaceae Faboideae	<i>Vatairea</i>	<i>guianensis</i>	Aubl.
1991	AAO 4148	Órgãos aéreos	Clusiaceae	<i>Simphonia</i>	<i>globulifera</i>	L.
1999	AAO 4199	Órgãos aéreos	Myristicaceae	<i>Iryanthera</i>	<i>laevis</i>	Markgr.

Legenda: Os números ímpares dos extratos referem-se aos extratos orgânicos e os pares, aos aquosos.

Tabela 5. Resultados antimicrobianos obtidos pelo método da disco difusão em ágar, adição de 10 µL de extratos testados.

Extrato	D - 1 (H)	D - 1 (V)	D - 2 (H)	D - 2 (V)	D - 3 (H)	D - 3 (V)	Média(mm)	Desvio padrão
55	9,94	9,81	9,65	9,60	9,93	9,92	9,80	0,15
321	7,49	7,28	7,56	7,30	6,86	6,84	7,22	0,31
352	8,99	9,17	10,79	9,39	10,13	9,80	9,71	0,67
429	7,30	6,69	7,78	7,28	7,22	6,88	7,19	0,38
841	10,66	9,37	9,70	9,45	9,30	9,35	9,70	0,52
1247	8,40	9,07	9,04	10,00	9,64	9,20	9,22	0,55
1257	11,58	11,37	12,72	11,91	12,30	13,18	12,17	0,69
1259	7,35	6,96	7,86	7,09	6,94	7,27	7,24	0,34
1298	9,83	9,88	10,93	10,61	11,28	11,61	10,69	0,73
1373	8,55	8,59	10,00	10,02	10,40	9,45	9,50	0,78
1389	9,65	9,12	11,66	11,77	12,16	12,08	11,07	1,33
1395	7,52	7,32	8,73	9,04	8,64	9,43	8,44	0,84
1461	8,42	8,85	9,02	9,24	8,67	8,85	8,84	0,28
1493	13,41	13,31	13,21	13,67	13,86	16,75	13,54	1,35
1497	11,28	10,49	10,14	10,35	11,08	10,31	10,60	0,46
1525	13,26	13,11	13,58	12,56	13,63	12,66	13,13	0,45
1543	6,94	7,53	7,91	7,54	7,85	8,83	7,76	0,62
1549	11,31	12,42	8,83	9,50	9,16	9,42	10,10	1,43
1637	7,25	8,46	9,63	8,51	7,93	7,89	8,27	0,81
1743	9,40	9,49	9,78	9,29	9,91	10,27	9,69	0,37
1765	8,44	8,53	8,51	10,17	10,13	9,65	9,23	0,84
1905	11,58	11,57	7,75	7,56	10,06	10,40	9,82	1,79
1923	9,96	10,20	10,31	9,94	9,65	9,87	9,98	0,24
1991	15,00	15,36	13,03	14,57	14,24	14,35	14,42	0,80
1999	12,73	12,72	10,41	10,16	10,31	9,83	11,02	1,33

Legenda: D – Disco de papel estéril; H – Horizontal; V – Vertical; mm – milímetros

Tabela 6. Resultados antimicrobianos encontrados pelo método da disco difusão em ágar, adição de 10 µL de substâncias padrão, diluídas até as concentrações usualmente empregadas em Odontologia.

Origem	Substâncias padrão	D - 1 (H)	D - 1 (V)	D - 2 (H)	D - 2 (V)	D - 3 (H)	D - 3 (V)	Média	d.p.
Manipulado	HS 1%	10,95	9,66	11,74	10,88	10,79	10,16	10,69	0,72
Manipulado	HS 1%	13,31	12,61	10,98	11,67	12,37	12,36	12,21	0,80
Comercializado	HS 0,5%	9,42	9,38	9,42	9,29	8,71	8,29	9,08	0,47
Comercializado	HS 0,5%	9,25	9,85	8,23	8,74	7,53	7,67	8,54	0,91
Manipulado	CHX 0,12%	15,39	15,29	16,66	16,36	15,51	15,82	12,53	0,56
Manipulado	CHX 1%	11,55	11,30	13,46	13,38	12,71	12,78	15,83	0,91
Manipulado	CHX 2%	17,36	17,27	18,17	18,11	15,73	15,84	17,03	1,07
Manipulado	CHX 20%	19,40	20,20	20,60	21,10	21,50	21,20	20,66	0,77
Comercializado	CHX 0,12%	12,45	12,20	11,50	12,70	12,17	12,25	12,20	0,40
Comercializado	CHX 1%	16,15	16,15	16,60	16,85	16,10	16,15	16,33	0,31
Comercializado	CHX 2%	17,30	17,35	17,70	17,30	16,15	16,30	17,01	0,63

Legenda: D – Disco de papel estéril; H – Horizontal; V – Vertical; mm – milímetros; HS – Hipoclorito de sódio; CHX – Digluconato de clorexidina; d.p. – desvio padrão.

Tabela 7. Resultados antimicrobianos obtidos pelo método da microdiluição em caldo com as substâncias padrão digluconato de clorexidina (CHX) e hipoclorito de sódio (HS).

Origem	Substâncias padrão	1x10²	1x 10³	1x 10⁴	1x 10⁵	1x 10⁶	1x 10⁷
Manipulado	HS 0,5%	C	C	C	C	C	C
Manipulado	HS 1%	I	I	I	I	I	I
Comercializado	HS 1%	X	X	X	X	X	X
Comercializado	HS 0,5%	X	X	X	X	X	X
Manipulado	CHX 0,12%	C	C	C	C	C	C
Manipulado	CHX 2%	I	I	I	I	I	C
Manipulado	CHX 1%	I	I	I	I	C	C
Manipulado	CHX 20%	X	X	X	X	X	X
Comercializado	CHX 0,12%	C	C	C	C	C	C
Comercializado	CHX 2%	X	X	X	X	X	X
Comercializado	CHX 1%	I	I	I	I	C	C

Legenda: C – crescimento bacteriano; I – inibição bacteriana; X – não foi testado; UFC/mL – concentração bacteriana

Tabela 8. Resultados obtidos do ensaio de microdiluição em caldo para a obtenção da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima dos extratos ativos, testados nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL

NE	1×10^2 UFC/mL		1×10^3 UFC/mL		1×10^4 UFC/mL		1×10^5 UFC/mL		1×10^6 UFC/mL		1×10^7 UFC/mL	
	CIM	CBM										
55	0,6<CIM<1,3	1,3	1,3<CIM<2,5	2,5	0,6<CIM<1,3	1,3	5<CIM<12,5	12,5	2,5<CIM<5	5	7,5<CIM<12,5	12,5
321	0,08	0,3	0,6<CIM<1,3	1,3	0,6<CIM<1,3	1,3	5<CIM<12,5	12,5	>12,5	>12,5	7,5<CIM<12,5	12,5
352	0,2<CIM<0,3	0,3	0,3<CIM<0,6	0,6	2,5<CIM<5	5	2,5<CIM<5	5	2,5<CIM<5	5	5<CIM<12,5	12,5
429	0,08	0,3	2<CIM<0,3	0,3	1,3<CIM<2,5	2,5	7,5<CIM<12,5	12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
841	0,08	0,3	0,3<CIM<0,6	0,6	0,08<CIM<0,2	0,2	0,2<CIM<0,3	0,3	0,3<CIM<0,6	0,6	0,6<CIM<1,3	1,3
1247	1,3<CIM<2,5	2,5	0,3<CIM<0,6	0,6	2,5<CIM<1,3	1,3	5<CIM<12,5	12,5	12,5<CIM<7,5	7,5	12,5<CIM<7,5	7,5
1257	0,08<CIM<0,2	0,2	0,2<CIM<0,3	0,3								
1259	2,5<CIM<5	5	12,5<CIM<7,5	7,5	>12,5	>12,5	7,5<CIM<12,5	12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
1298	0,3<CIM<0,6	0,6	0,3<CIM<0,6	0,6	0,3<CIM<0,6	0,6	0,3<CIM<0,6	0,6	0,6<CIM<1,3	1,3	0,3<CIM<0,6	0,6
1373	1,3<CIM<2,5	2,5	5<CIM<12,5	12,5	CIM>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
1389	0,6<CIM<1,3	1,3	0,2<CIM<0,3	0,3	1,3<CIM<2,5	2,5	1,3<CIM<2,5	2,5	5<CIM<12,5	12,5	5<CIM<12,5	12,5
1395	0,08<CIM<0,2	0,2	0,08<CIM<0,2	0,2	0,08<CIM<0,2	0,2	0,08<CIM<0,2	0,2	0,2<CIM<0,3	0,3	0,6<CIM<1,3	1,3
1461	12,5<CIM<7,5	7,5	5<CIM<12,5	12,5	12,5<CIM<7,5	7,5	7,5<CIM<12,5	12,5	12,5<CIM<7,5	7,5	7,5<CIM<12,5	12,5
1493	<0,04	≤0,04	<0,04	≤0,04	<0,04	≤0,04	<0,04	≤0,04	<0,04	≤0,04	<0,04	≤0,04
1497	0,08<CIM<0,2	0,2	0,04<CIM<0,08	0,08	0,04<CIM<0,08	0,08	0,2<CIM<0,3	0,3	>12,5	>12,5	12,5<CIM<7,5	7,5
1525	0,6<CIM<1,3	1,3	1,3<CIM<2,5	2,5								
1543	>12,5	>12,5	12,5<CIM<7,5	7,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
1549	0,08<CIM<0,2	0,2	0,3<CIM<0,6	0,6	0,6<CIM<1,3	1,3	0,2	0,6	0,6<CIM<1,3	1,3	0,6<CIM<1,3	1,3
1637	<0,04	≤0,04	<0,04	≤0,04	≤0,04	0,2	≤0,04	0,6	≤0,04	5	5<CIM<12,5	12,5
1743	0,6<CIM<1,3	1,3	1,3<CIM<2,5	2,5	1,3<CIM<2,5	2,5	1,3<CIM<2,5	2,5	2,5<CIM<5	5	2,5<CIM<5	5
1765	0,04<CIM<0,08	0,08	0,04<CIM<0,08	0,08	0,04<CIM<0,08	0,08	0,04<CIM<0,08	0,08	0,08<CIM<0,2	0,2	0,2<CIM<0,3	0,3
1905	0,2<CIM<0,3	0,3	0,2<CIM<0,3	0,3	1,3<CIM<2,5	2,5	2,5<CIM<5	5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
1923	0,2<CIM<0,3	0,3	0,3<CIM<0,6	0,6	2,5<CIM<5	5	2,5<CIM<5	5	0,3<CIM<0,6	0,6	2,5<CIM<5	5
1991	0,08<CIM<0,2	0,2	0,08<CIM<0,2	0,2	0,2<CIM<0,3	0,3	0,08<CIM<0,2	0,2	1,3<CIM<2,5	2,5	2,5<CIM<5	5
1999	0,2<CIM<0,3	0,3	1,3<CIM<2,5	2,5	2,5<CIM<5	5	>12,5	>12,5	12,5<CIM<7,5	7,5	>12,5	>12,5

Observação: os valores das concentrações expressos na tabela foram divididos por 20, de modo a se fornecer a concentração final no poço.

Legenda: NE=número de extrato; extrato ímpar=extrato orgânico; extrato par=extrato aquoso.

A Tabela 9 apresenta os resultados do ensaio de microdiluição em caldo para a obtenção da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos ativos, testados nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL e foi utilizada como modelo para confecção dos gráficos a seguir.

Tabela 9. Resultados usados para obtenção dos gráficos experimentais obtidos do ensaio de microdiluição em caldo para a obtenção da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos ativos, testados nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

Número do extrato	Concentrações das suspensões bacterianas (UFC/mL)					
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7
55	1,3	2,5	1,3	12,5	5,0	12,5
321	0,3	1,3	1,3	12,5	>12,5	12,5
352	0,3	0,6	5	5	5	12,5
429	0,3	0,3	2,5	12,5	>12,5	>12,5
841	0,3	0,6	0,2	0,3	0,6	1,3
1247	2,5	0,6	1,3	12,5	10	10
1257	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1259	5	10	>12,5	12,5	>12,5	>12,5
1298	0,6	0,6	0,6	0,6	1,3	0,6
1373	2,5	12,5	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
1389	1,3	0,3	2,5	2,5	12,5	12,5
1395	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	1,3
1461	10	12,5	10	12,5	10	12,5
1493	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$
1497	0,2	0,08	0,08	0,3	>12,5	10
1525	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	2,5
1543	12,5	10	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5
1549	0,2	0,6	1,3	0,6	1,3	1,3
1637	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	0,2	0,6	5	12,5
1743	1,3	2,5	2,5	2,5	5	5
1765	0,08	0,08	0,08	0,08	0,2	0,3
1905	0,3	0,3	2,5	5	>12,5	>12,5
1923	0,3	0,6	5	5	0,6	5
1991	0,2	0,2	0,3	0,2	2,5	5
1999	0,3	2,5	5	>12,5	10	>12,5

Observação: Não apresenta a simbologia < e > porque há uma limitação do programa Excel em expressar essa condição matemática de modo que apareçam os valores mais baixos.

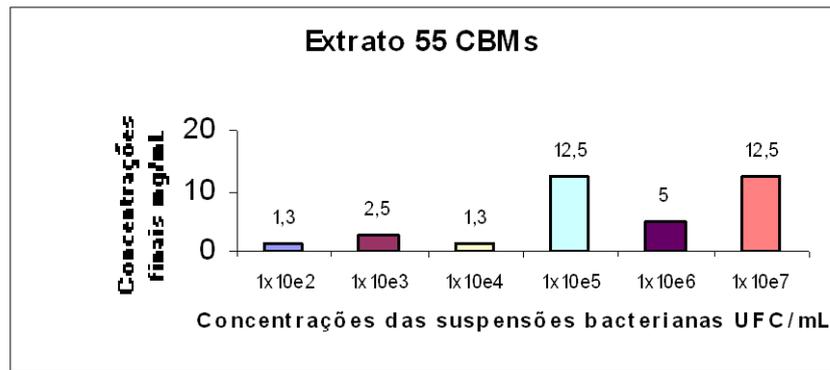


Gráfico 1. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 55 obtido das folhas da espécie *Macrolobium multijugum*, família Fabaceae Caesalpinioideae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

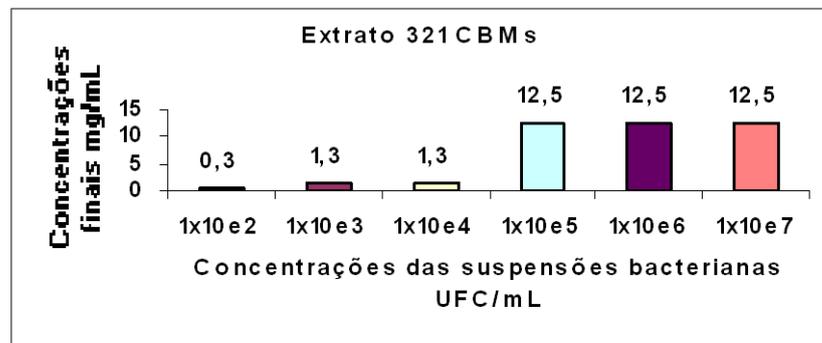


Gráfico 2. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 321 obtido das folhas e flores da espécie *Psidium densicomum*, família Myrtaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

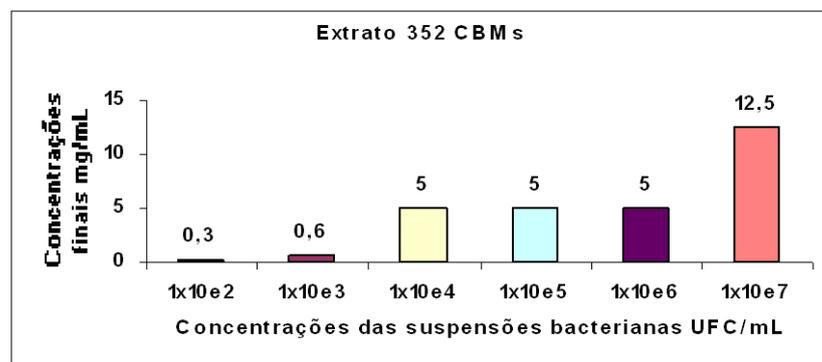


Gráfico 3. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 352 obtido do caule da espécie *Stryphnodendron pulcherrimum*, família Fabaceae Mimosoideae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

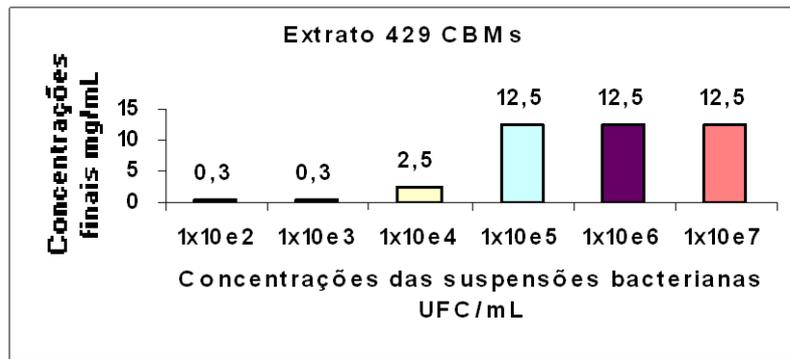


Gráfico 4. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 429 obtido do caule da espécie *Roupala* sp., família Proteacea, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

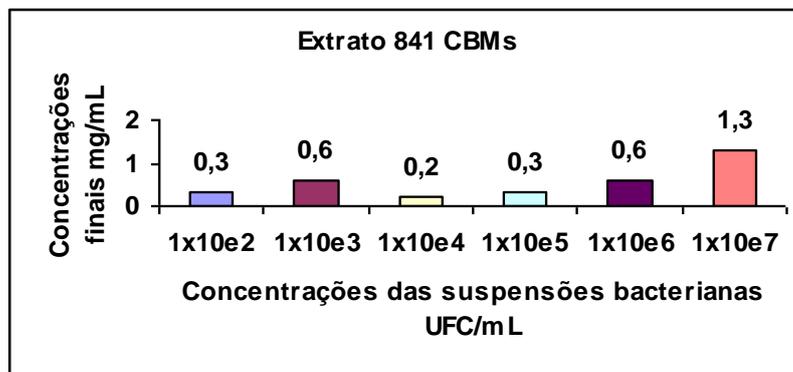


Gráfico 5. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 841 obtido dos órgãos aéreas da espécie *Rapanea parvifolia*, família Myrsinaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

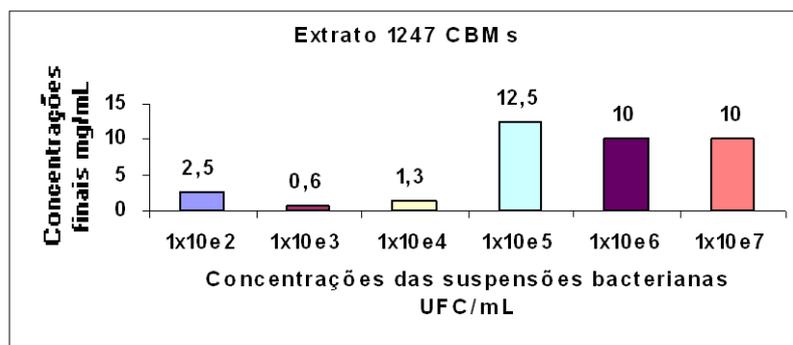


Gráfico 6. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1247 obtido dos órgãos aéreas da espécie *Psidium densicomum*, família Myrtaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

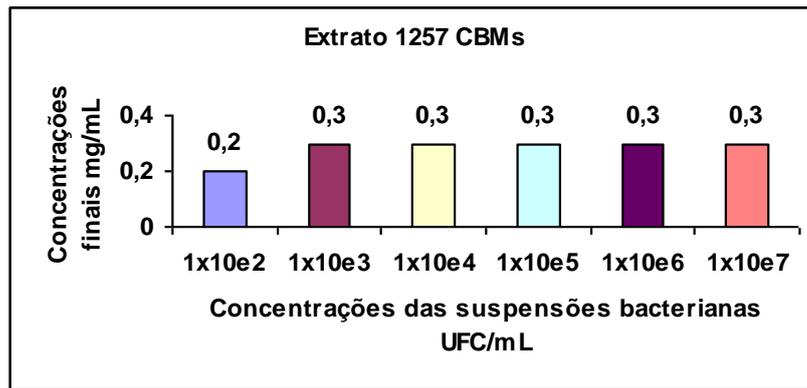


Gráfico 7. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1257 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Palicourea guianensis*, família Rubiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

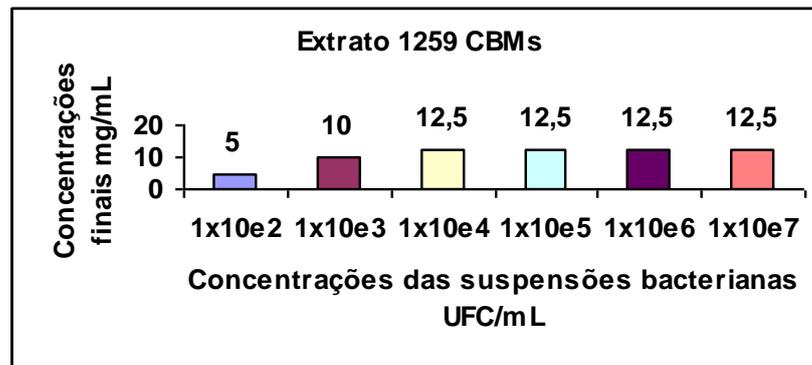


Gráfico 8. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1259 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Piper sp.*, família Piperaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

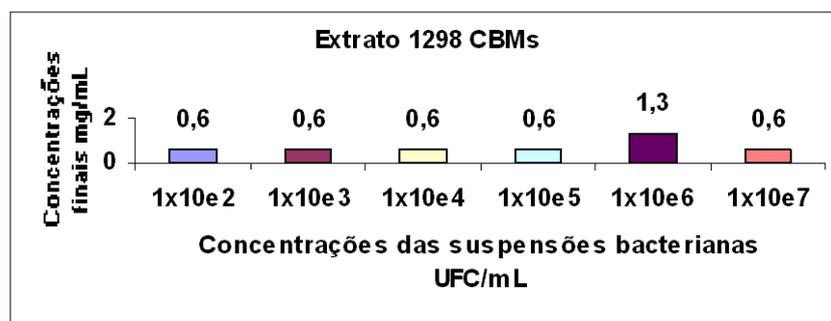


Gráfico 9. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1298, obtido do caule da espécie *Ocotea myriantha*, família Lauraceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

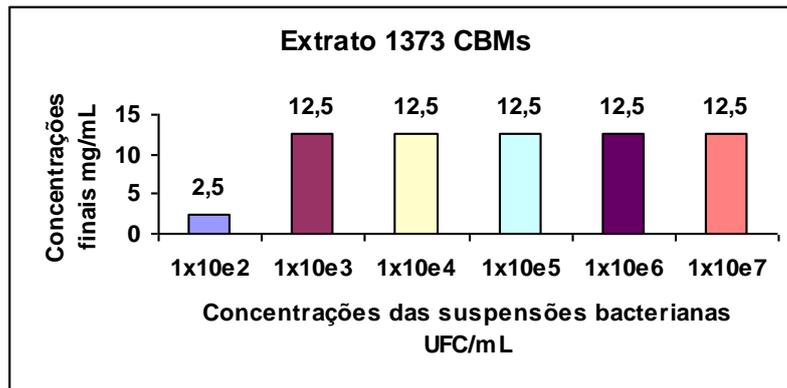


Gráfico 10. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1373 obtido das folhas da espécie *Garcinia cf. macrophylla*, família Clusiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

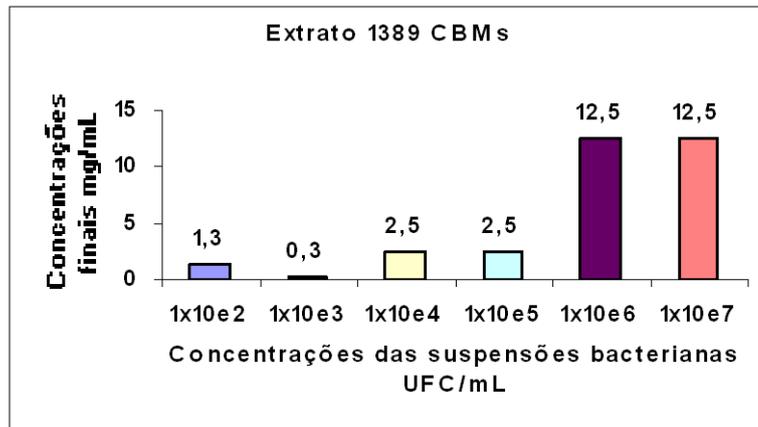


Gráfico 11. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1389 obtido do caule da espécie *Moronobea coccinea*, família Clusiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

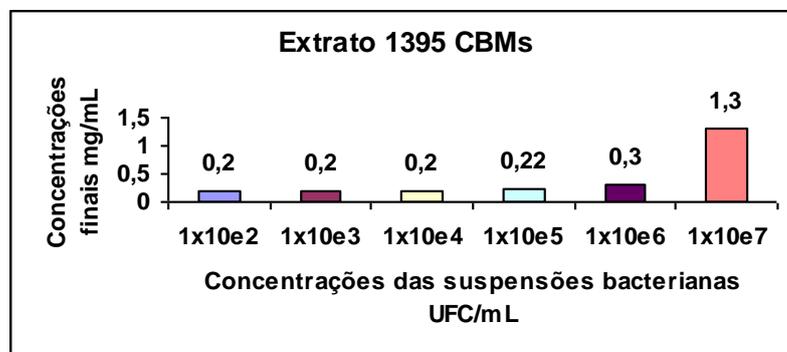


Gráfico 12. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1395 obtido das folhas da espécie *Hymenaea parvifolia*, família Fabaceae Caesalpinioideae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

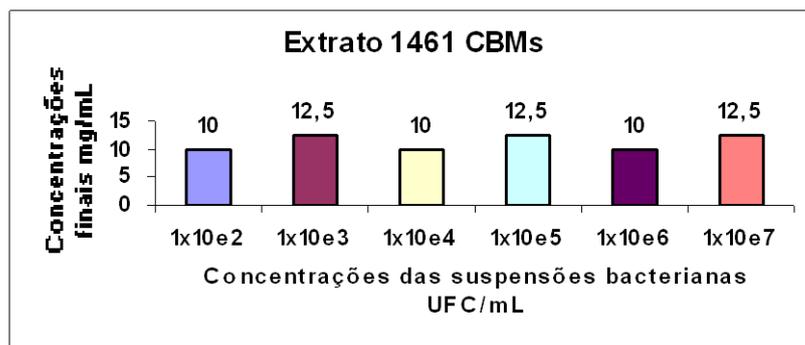


Gráfico 13. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1461 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Paullinia cf. alata*, família Sapindaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

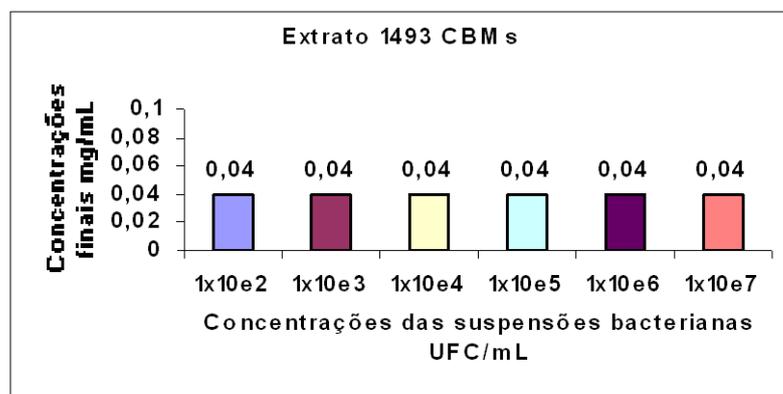


Gráfico 14. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1493 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Ipomoea sp.*, família Convolvulaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

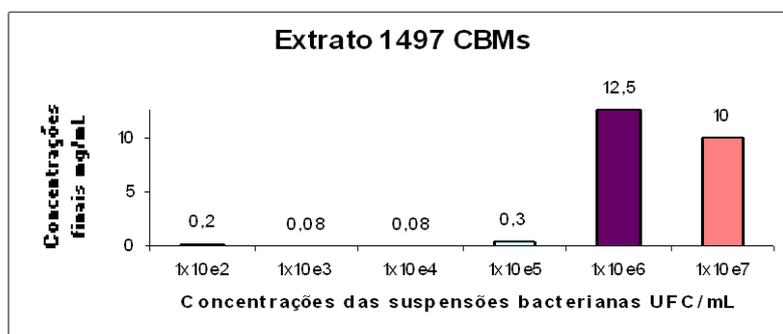


Gráfico 15. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1497 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Sorocea duckei*, família Moraceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

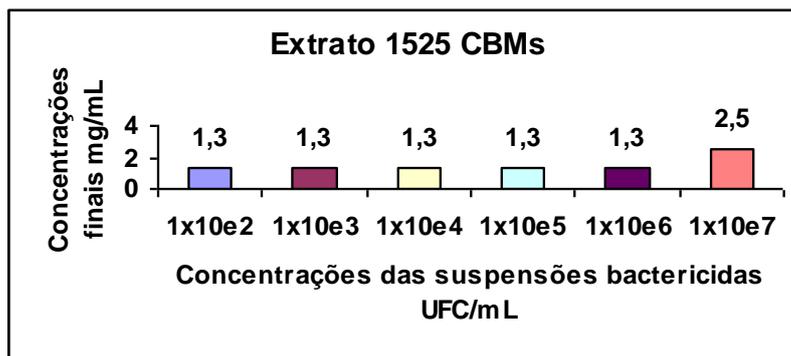


Gráfico 16. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1525 obtido do caule da espécie *Connarus ruber* var. *ruber*, família Connaraceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

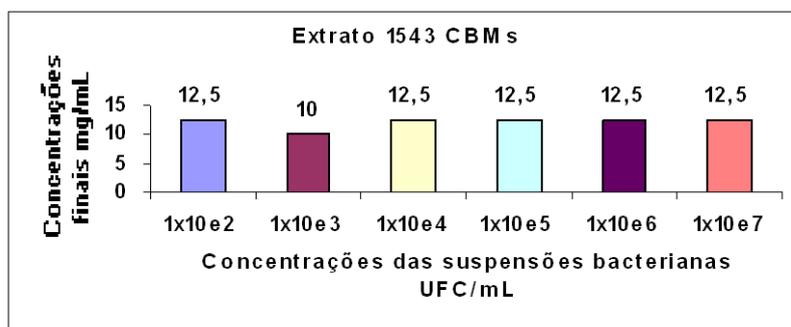


Gráfico 17. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1543 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Tovomita longifolia*, família Clusiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

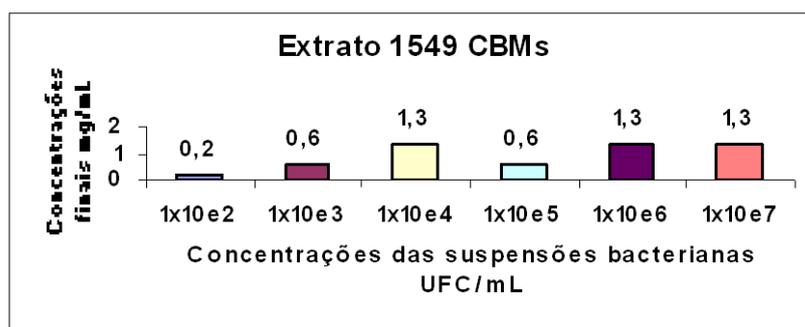


Gráfico 18. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1549 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Combretum rotundifolium*, família Combretaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ UFC/mL.

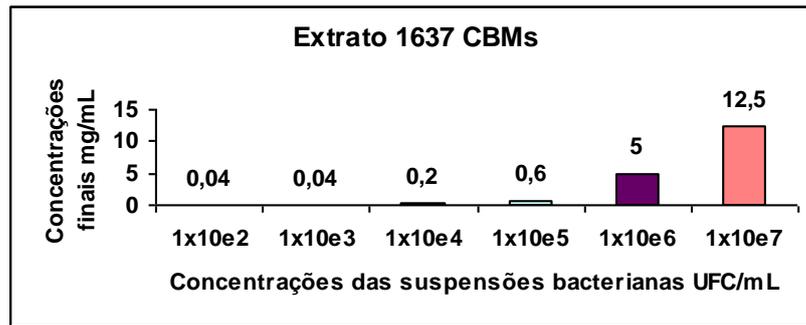


Gráfico 19. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1637 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Diclinanona calycina*, família Annonaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

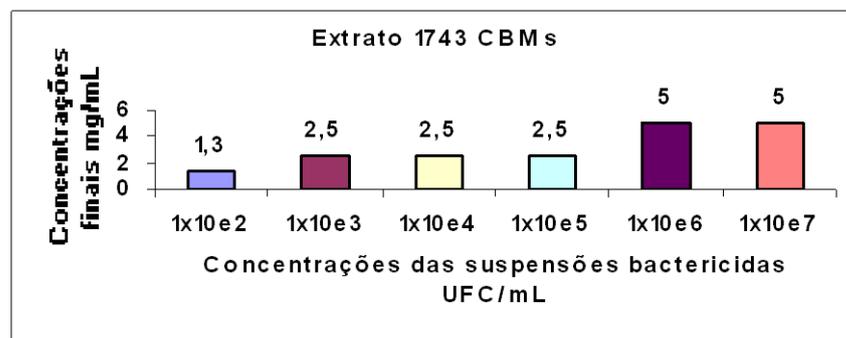


Gráfico 20. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1743 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Connarus cf. ruber var. sprucei*, família Connaraceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

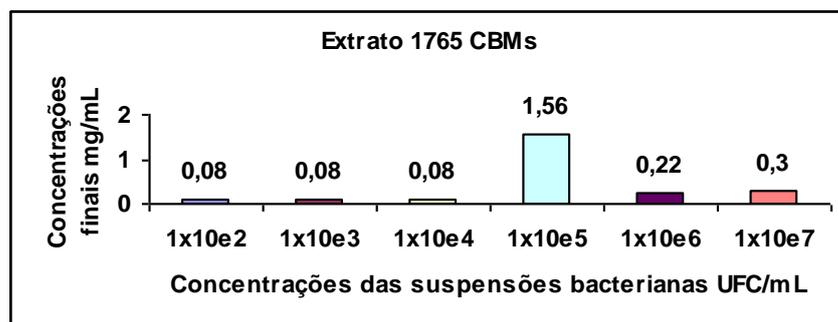


Gráfico 21. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1765 obtido das flores da espécie *Moronobea coccinea*, família Clusiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

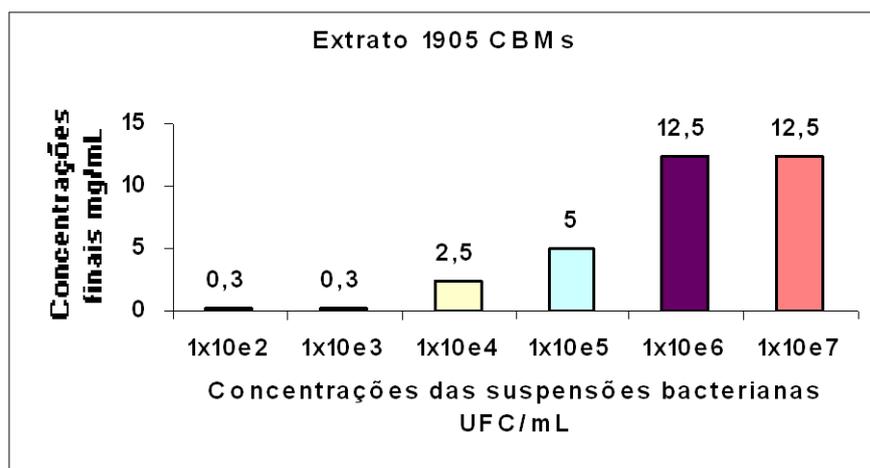


Gráfico 22. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1905 obtido do caule da espécie *Simphonia globulifera*, família Clusiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

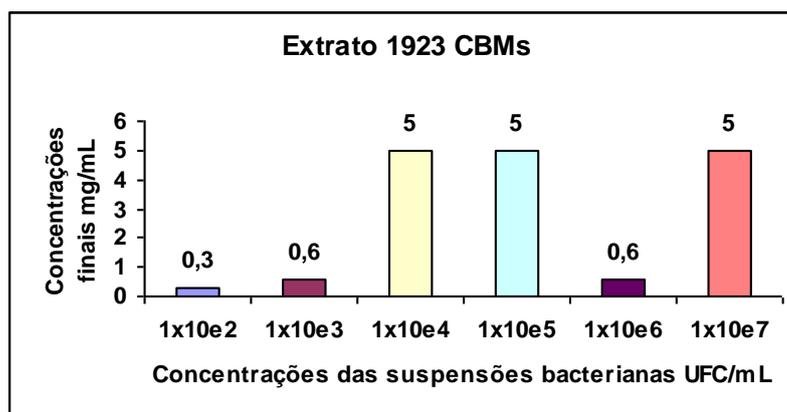


Gráfico 23. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1923 obtido dos órgãos da espécie *Vatairea guianensis*, família Fabaceae Faboideae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

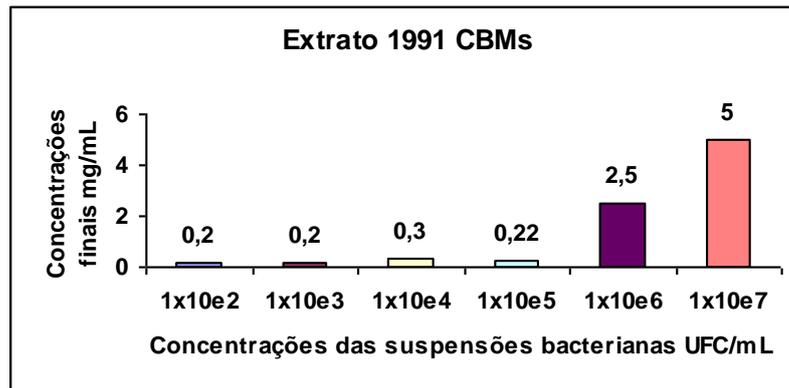


Gráfico 24. Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1991 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Simphonia globulifera*, família Clusiaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

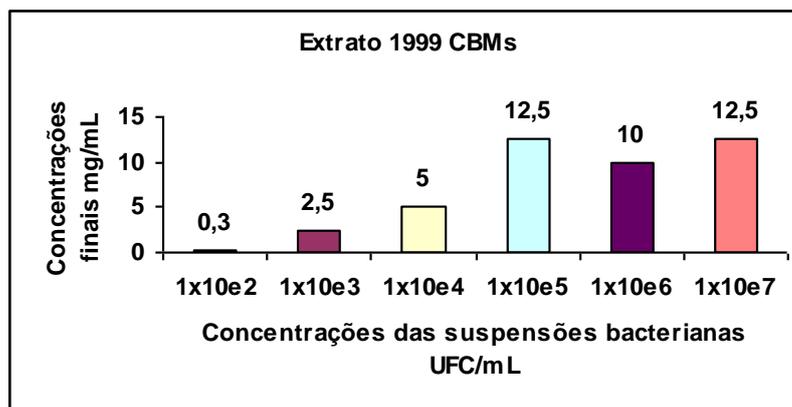


Gráfico 25 Concentrações bactericidas mínimas do extrato 1999 obtido dos órgãos aéreos da espécie *Iryanthera laevis*, família Myrsinaceae, testado nas concentrações de 12,5, 10,0, 7,5, 5,0, 2,5, 1,3, 0,6, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 mg/mL, contra suspensões bacterianas de 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 UFC/mL.

Tabela 10. Resultados obtidos a partir do ensaio de disco difusão em ágar (DDA) e de microdiluição em caldo (MDC) realizados com os resíduos clorofórmico (CHCl₃), butanólico (BuOH) e aquoso (AQ), obtidos de cada um dos 25 extratos ativos, realizados para seleção dos resíduos ativos. Os resíduos foram diluídos em 200 mg/mL e a suspensão bacteriana preparada a 0,5 McFarland para o ensaio DDA e preparados a 1 x 10⁶ UFC/mL.

Extrato	DDA			MDC		
	Resíduo CHCl ₃	Resíduo BuOH	Resíduo aquoso	Resíduo CHCl ₃	Resíduo BuOH	Resíduo aquoso
55	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não
321	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
352	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
429	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
841	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
1247	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
1257	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
1259	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
1298	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
1373	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
1389	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
1395	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
1461	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
1493	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
1497	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
1525	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
1543	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
1549	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
1637	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
1743	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
1765	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
1905	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
1923	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
1991	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
1999	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

Legenda: CHCl₃=clorofórmio; BuOH=n-butanol

Tabela 11. Resultados obtidos da análise realizada em triplicata realizada com os resíduos que apresentaram atividade no ensaio da disco difusão em ágar anteriormente realizado. Os resíduos foram diluídos em 200 mg/mL e a suspensão bacteriana preparada a 0,5 McFarland.

Extra	CHCl ₃								BuOH						Aquoso									
	H1	V1	H2	V2	H3	V3	M.	D. p.	H1	V1	H2	V2	H3	V3	M.	D. p.	H1	V1	H2	V2	H3	V3	M.	D.p.
55									10,44	10,81	12,17	12,26	11,76	12,23	11,61	0,79								
321	7,42	7,54	8,21	8,18	7,96	8,07	7,90	0,34	9,74	9,79	10,31	10,91	9,45	9,81	10,00	0,52	16,58	17,07	16,66	17,00	16,81	16,54	16,78	0,22
352	-	-	-	-	-	-	-	-	10,81	11,00	11,93	12,03	11,70	11,36	11,47	0,50	16,41	16,42	15,39	15,30	15,57	16,72	15,97	0,62
429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
841	7,06	7,69	7,73	7,50	7,35	7,67	7,50	0,26	11,53	11,91	11,93	12,03	12,43	11,63	11,91	0,32	9,12	9,14	9,59	9,46	9,66	9,59	9,43	0,24
1247	9,87	9,39	10,19	11,93	9,29	11,17	10,31	1,04	10,46	9,92	10,09	10,02	9,90	9,75	10,02	0,24	10,44	9,67	10,17	9,87	9,89	9,95	10,00	0,27
1257	9,47	10,05	10,10	9,80	10,27	10,22	9,99	0,30	11,78	12,60	11,58	12,62	11,86	12,34	12,13	0,45	10,64	11,01	10,89	11,41	11,21	11,07	11,04	0,26
1259	8,06	7,68	8,55	8,31	8,12	8,23	8,16	0,29	12,63	12,20	12,96	12,78	11,28	12,64	12,42	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-
1298	7,63	7,86	8,49	7,91	8,23	8,51	8,11	0,36	12,41	12,46	12,45	12,89	12,23	13,07	12,59	0,32	8,05	8,20	8,02	7,89	7,84	7,95	7,99	0,13
1373	-	-	-	-	-	-	-	-	8,25	8,61	7,78	8,47	8,24	9,21	8,43	0,48	7,13	7,21	7,57	6,79	7,70	7,19	7,27	0,33
1389	8,79	9,18	8,87	8,63	8,78	8,47	8,79	0,24	12,39	12,97	12,74	13,11	12,57	12,34	12,69	0,31	9,76	9,87	9,69	9,30	9,99	9,61	9,70	0,24
1395	-	-	-	-	-	-	-	-	7,45	7,16	7,24	7,79	7,29	7,12	7,34	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
1461	-	-	-	-	-	-	-	-	9,20	8,86	9,25	9,19	8,66	8,49	8,94	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-
1493	13,25	13,29	14,49	13,78	13,69	13,61	13,69	0,45	12,98	12,98	14,72	13,70	14,32	13,89	13,77	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-
1497	8,43	8,00	9,36	8,49	8,97	8,66	8,65	0,47	9,96	10,37	10,96	10,94	12,82	12,51	11,26	1,16	-	-	-	-	-	-	-	-
1525	-	-	-	-	-	-	-	-	11,70	11,15	12,02	12,10	12,17	11,88	11,84	0,38	9,30	9,93	10,68	10,79	9,47	9,03	9,87	0,73
1543	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	10,83	10,93	11,37	11,01	11,46	11,83	11,24	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1637	9,08	9,44	8,99	9,60	8,34	8,56	9,00	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1743	-	-	-	-	-	-	-	-	11,03	11,11	12,07	12,73	11,47	11,94	11,73	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	8,42	8,78	8,90	8,27	8,78	9,25	8,73	0,35	10,39	10,14	10,68	9,70	10,38	10,16	10,24	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-
1905	8,43	8,81	8,46	8,76	9,61	9,62	8,95	0,54	9,47	9,59	9,36	9,87	8,94	8,54	9,30	0,48	10,20	10,00	9,77	10,25	10,49	10,89	10,27	0,39
1923	8,17	8,02	9,83	9,10	9,01	9,34	8,91	0,70	8,62	8,10	8,54	8,75	8,07	8,72	8,47	0,31	-	-	-	-	-	-	-	-
1991	10,41	10,75	11,36	11,30	12,07	12,63	11,42	0,82	13,81	14,84	14,23	14,38	13,62	13,90	14,13	0,45	8,86	9,17	8,88	9,16	8,80	9,59	-	-
1999	-	-	-	-	-	-	-	-	8,55	8,35	8,54	9,00	10,20	9,61	9,04	0,73	7,64	7,52	7,39	7,24	7,85	7,78	-	-

Legenda: Extra = extrato; M. = média; d.p. = desvio padrão; H=medida horizontal do halo de inibição; V=medida vertical do halo de inibição. Os resultados estão expressos em milímetros. CHCl₃=resíduo clorofórmico; BuOH=resíduo butanólico; Aquoso=resíduo aquoso.

Tabela 12. Resultados obtidos da cromatografia realizada com os resíduos clorofórmico (CHCl₃), butanólico (BuOH) e aquoso (AQ) obtidos de cada um dos 75. A análise cromatográfica foi feita pelo número de manchas dos resíduos em relação ao número de manchas do extrato bruto.

Extrato	1º sistema			2ª sistema			3ª sistema		
	CHCl₃	BuOH	AQ	CHCl₃	BuOH	AQ	CHCl₃	BuOH	AQ
55	X	--	--	--	--	--	X	X	--
321	X	--	--	X	--	--	X	X	X
352	--	--	--	--	--	--	X	X	X
429	X	--	--	X	--	--	X	X	--
841	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1247	X	--	--	X	X	--	X	X	--
1257	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1259	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1298	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1373	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1389	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1395	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1461	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1493	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1497	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1525	X	X	--	X	X	--	X	X	X
1543	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1549	X	--	--	X	--	--	X	X	X
1637	X	--	--	X	--	--	X	X	X
1743	X	--	--	X	--	--	X	X	--
1765	X	--	--	X	X	--	X	X	--
1905	X	--	--	X	--	--	X	X	X
1923	X	--	--	X	--	--	X	--	--
1991	X	--	--	X	X	--	X	X	--
1999	X	--	--	X	--	--	X	X	--

Legenda: X – corresponde à presença de mancha no resíduo; (--) - corresponde à ausência de mancha no resíduo.

Os resultados obtidos a partir da análise do potencial antioxidante dos extratos e seus resíduos estão expressos na tabela 13, dados em função do número de manchas que apresentaram reação positiva ao β -caroteno, ou seja, revelação na cor amarelo-alaranjado após exposição à luz.

Tabela 13. Resultados obtidos a partir da partição líquido - líquido realizado com os resíduos clorofórmico (CHCl₃), butanólico (BuOH) e aquoso (AQ) obtido de cada um dos 75. Análise cromatográfica em relação às manchas positivas ao reagente β-caroteno.

<i>Extrato</i>	3º sistema		
	CHCl ₃	BuOH	AQ
55	--	X	--
321	--	--	--
352	--	--	--
429	--	--	--
841	--	X	--
1247	--	--	--
1257	--	X	--
1259	--	--	--
1298	--	--	--
1373	--	X	--
1389	--	X	--
1395	--	--	--
1461	--	--	--
1493	--	--	--
1497	--	--	--
1525	--	X	X
1543	--	--	--
1549	--	--	--
1637	X	--	--
1743	--	--	--
1765	--	--	--
1905	--	X	X
1923	--	--	--
1991	--	X	--
1999	--	X	--

Legenda: X – corresponde a presença de mancha amarela (positivo para o reagente β-caroteno) e -- - correspondente a ausência de mancha.

6 DISCUSSÃO

6.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é um indicador biológico extensivamente avaliado nas patologias humanas, e aquelas que acometem a cavidade bucal tem importância para este trabalho, em particular, porque ocorrem em lesões de cárie, em infecções periodontais e endodônticas. Nos casos de doenças endodônticas, torna-se patente a ocorrência de *E. faecalis* no insucesso do tratamento endodôntico (SUNDQVIST, FIGDOR 2003; KRISTICH *et al.* 2004; DUGGAN, SEDGLEY 2007; GIARDINO *et al.* 2007). Nestes casos, é a bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa mais importante na perpetuação da patologia periapical, que surge em decorrência da ineficácia no tratamento endodôntico, acarretada pela ineficaz desinfecção do canal.

Atualmente, o uso dos antimicrobianos é maciço, nos tratamentos sistêmicos e nas infecções bucais como doenças cárie, periodontais e nas endodônticas. Em Odontologia, o uso de clorexidina e de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações é consagrado, porém, ambas as substâncias apresentam efeitos colaterais que são desconsiderados quando eleitas, em função de seu benefício terapêutico. Substâncias que produzem eficácia terapêutica semelhante, e apresentam menos efeitos colaterais podem ser empregadas na terapêutica odontológica.

É crescente o número de estudos que procuram encontrar atividade antimicrobiana a partir de substâncias isoladas de extratos vegetais contra diversos micro-organismos. A Universidade Paulista – UNIP instituiu estudos de bioprospecção de extratos vegetais de plantas da Amazônia e Mata Atlântica, em um estudo multidisciplinar na área da Saúde, que abrange diversas áreas específicas, como a Odontologia, Medicina Veterinária, Farmácia e Biologia, e outras correlatas, como a Química. Do ponto de vista farmacológico ou fitoquímico, torna-se imediata a necessidade de se implementar estudos em grande escala em determinadas regiões, como no Brasil. Souza e Wiest (2007) identificaram e compararam a atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), pertencente a família Verbenaceae, coletada na cidade de

Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, e difundida em outros países como Argentina, Paraguai e Uruguai, contra *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Pasteurella multocida* e *Escherichia coli*. Estrela, Pimenta, Estrela (2005) utilizam o disco difusão em ágar e a microdiluição em caldo como modelos antimicrobianos para testar a atividade antimicrobiana de diversas substâncias contra *E. faecalis*, usando metodologias de análise similares às empregadas no presente trabalho.

6.2 Ensaio do disco difusão em ágar

Os 25 extratos analisados foram obtidos de plantas pertencentes a 15 famílias: Clusiaceae (6), Fabaceae (4), Connaraceae (2), Myrtaceae (2), Protaceae, Myrsinaceae, Rubiaceae, Piperaceae, Lauraceae, Sapindaceae, Convolvulaceae, Moraceae, Combretaceae, Annonaceae e Myristicaceae (1) de cada. Dos 25 extratos vegetais testados no modelo de disco difusão em ágar Müller Hinton, quatro apresentaram os maiores halos de inibição e pertencem às famílias Clusiaceae, Convolvulaceae, Connaraceae e Rubiaceae. O extrato 1991, pertencente à família Clusiaceae, foi obtido de *Simphonia globulifera*, e apresentou o maior halo de inibição (14,42 mm). O extrato 1493, obtido de *Ipomoea* sp. (Convolvulaceae), apresentou halo de inibição de 13,54 mm. O extrato 1525, obtido de *Connarus* cf. *ruber* var. *ruber* (Connaraceae), apresentou halo de inibição de 13,13 mm. O extrato 1257, obtido de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) apresentou halo de inibição de 12,17 mm.

Os resultados dos halos de inibição das soluções de clorexidina 0,12, 1 e 2% manipuladas foram muito próximos dos resultados obtidos para as soluções de clorexidina comercializada nas mesmas concentrações: 12,53; 15,83 e 17,03 mm e 12,20; 16,33 e 17,01, respectivamente. Já com as soluções de hipoclorito de sódio 0,5 e 1% manipuladas e comercializadas, observou-se que os valores de halo de inibição não se apresentaram semelhantes: 10,69 e 12,21 e 9,08 e 8,54, respectivamente.

Ao se fazer uma análise comparativa entre a atividade antibacteriana medida através do tamanho dos halos de inibição, observa-se que o extrato 1991

apresentou halo de inibição maior que todas as soluções de hipoclorito de sódio testadas e das soluções de clorexidina 1%. As outras soluções de clorexidina foram mais efetivas na inibição de crescimento.

Comparando os resultados dos extratos vegetais e o hipoclorito de sódio, verifica-se diferenças relevantes, pois o extrato 1991, 1493, 1525 e 1257 apresentaram halos de inibição maiores que o apresentado hipoclorito 1% manipulado. Muitos extratos apresentaram atividade superior à encontrada para a solução de hipoclorito de sódio 0,5%, como os extratos 55, 352, 841, 1247, 1298, 1373, 1389, 1461, 1497, 1549, 1743, 1765, 1905, 1923 e 1999.

Estes valores, comparados com as substâncias padrão, revelam que os extratos são ativos, porém não tão eficazes na inibição do crescimento das bactérias como as soluções de clorexidina, seja a comercializada, ou manipulada. Embora a eficácia não seja numericamente equiparável nesta etapa do estudo de fracionamento biodirecionado dos extratos, deve-se levar em conta que um extrato é extremamente complexo em sua composição química. Isto implica que a substância ativa pode estar diluída entre tantos componentes, fazendo com que sua eficácia seja diminuída. A comparação da potência do extrato com a potência de uma substância isolada é válida superficialmente apenas como uma referência, em função da complexidade dos extratos. O processo de fracionamento biodirecionado proporciona a identificação dos compostos ativos do extrato à uma forma mais rápida e eficaz, uma vez que se prioriza o fracionamento das amostras em função da manutenção da atividade. Com isso, é esperado que as frações apresentem uma atividade maior que o extrato, fração ou resíduo anterior, em função do enriquecimento da amostra com determinado(s) composto(s).

6.3 Ensaio da microdiluição em caldo

As análises feitas com os extratos resultaram em dados de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, pelo ensaio da microdiluição em caldo. Foram testadas concentrações variando entre 12,5 mg/mL a 0,04 mg/mL. Foram estabelecidas quais as concentrações seriam utilizadas para que os extratos fossem considerados ativos, ou com atividade intermediária ou com baixa atividade,

em relação às diferentes concentrações bacterianas utilizadas, que variam de 1×10^2 a 1×10^7 UFC/mL. Os extratos foram analisados em faixas de concentração variando de 0,04 a 0,30 mg/mL, de 0,31 a 5,0 mg/mL e 5,1 a 12,5 mg/mL.

Os 25 extratos foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima – CBM utilizando-se o teste da microdiluição em caldo. Este modelo experimental é o mais indicado para se avaliar a potência de fármacos antimicrobianos devido à facilidade de difusão do antimicrobiano no meio, o que proporciona um contato íntimo entre bactéria e agente antibacteriano, aumentando a sua eficácia e sensibilidade.

Os extratos foram preparados em diferentes concentrações, 20 vezes mais concentradas do que a concentração desejada, uma vez que são diluídos durante o procedimento de adição ao meio inoculado na microplaca. Foi determinado que as diferentes concentrações de extrato seriam testadas em meios cujos inóculos foram colocados em diferentes concentrações logarítmicas, variando de 1×10^2 a 1×10^7 UFC/mL. Cada extrato apresentou um comportamento próprio entre CIM e concentração do inóculo bacteriano (IB). Quanto aos dados de CBM X IB, o extrato que apresentou a atividade mais representativa foi o 1493, cujos valores de inibição foram inferiores ou iguais à menor concentração testada. Este extrato pertence à família das Convolvulaceae e foi obtido de *Ipomoea* sp. Ainda verificando a atividade bactericida dos extratos nas maiores concentrações de bactéria, verificou-se que os extratos 1257 e 1765 apresentaram concentrações bactericidas de 300 µg/mL. O extrato 1257 foi obtido de planta pertencente à família das Rubiaceae e o extrato 1765, de planta pertencente à família das Clusiaceae.

Considerando a atividade bactericida dos extratos na menor concentração de inóculo (1×10^2 UFC/mL), verificou-se que 15 extratos dentre os 25 apresentaram concentração bactericida mínima iguais ou inferiores a 300 µg/mL, o que implica um número bastante substancial de extratos com potencial para terem sua atividade aumentada após a realização dos procedimentos de fracionamento.

Nas concentrações de suspensões bacterianas de 1×10^2 a 10^6 UFC/mL encontrou-se respectivamente, 15, 10, 8, 7, e 4 números de extratos vegetais que apresentaram CBM iguais ou inferiores a 300 µg/mL, demonstrando que a medida que aumenta a concentração bacteriana há um número menor de extratos que apresentam atividade bactericida nas concentrações de extratos iguais e/ou entre 301 a 5000 µg/mL nas concentrações de suspensões bacterianas de 10^2 a 10^7

UFC/mL respectivamente, foram 8, 11, 13, 9, 10 e 8; estes valores sugerem um equilíbrio entre CBM e IB, uma vez que representa a maior faixa.

Os resultados referentes ao CBM x IB (10^2 a 10^7 UFC/mL) nas concentrações de extratos iguais e/ou entre 5001 µg/mL a 12500 µg/mL respectivamente, foram 2, 4, 4, 9, 11 e 14; estes valores reforçam a teoria dose resposta frente aos inóculos bacterianos, pois na maior concentração, de 1×10^7 , o número de extratos na maior dose que inibem esta concentração bacteriana é superior a 50% dentre os 25 extratos ativos.

Ao se fazer a análise individual da concentração bactericida mínima em todas as concentrações de inoculo bacteriano (10^2 a 10^7 UFC/mL), os seguintes resultados podem ser observados (Gráficos 1 a 25).

A concentração bactericida mínima do extrato 55, obtido das folhas da espécie *Macrolobium multijugum*, família Fabaceae Caesalpinioideae, observa-se que mesmo para a menor concentração de IB, uma dose intermediária apresentou atividade bactericida, e já é observada uma tendência de que em concentrações de IB intermediárias, há a necessidade de maiores quantidades de extrato para se alcançar a atividade bactericida. O extrato 321, obtido das folhas e flores da espécie *Psidium densicomum*, família Myrtaceae, apresentou atividade contra IB mais baixo, mas logo na concentração de IB de 1×10^5 UFC/mL já apresenta atividade bactericida apenas na concentração de extrato mais elevada. O extrato 352, obtido do caule da espécie *Stryphnodendron pulcherrimum*, família Fabaceae Mimosoideae, apresentou atividade bactericida nas concentrações de 0,30 mg/mL nos preparos de IB de 1×10^2 UFC/mL, e manteve-se praticamente constante na atividade frente às concentrações intermediárias de 10^4 a 10^6 em 5,0 mg/mL e somente na concentração de 10^7 UFC/mL agiu com a maior concentração de extrato. Já o extrato 429, obtido do caule da espécie *Roupaia sp.*, família Proteacea, apresenta uma atividade relativamente baixa até a concentração de IB de 10^5 UFC/mL, alterando bruscamente sua atividade para 12,5 mg/mL nas concentrações bacterianas seguintes. O extrato 841, obtido dos órgãos aéreos da espécie *Rapanea parvifolia*, família Myrsinaceae, apresentou atividade variando de relativamente baixa (0,3 mg/mL) a alta (1,3 mg/mL) em todas as concentrações bacterianas. O extrato 1247, obtido dos órgãos aéreos da espécie *Psidium densicomum*, família Myrtaceae, apresenta atividade bactericida intermediária, sendo que os valores de concentração variam de 2,5 a 7,5 entre as diferentes

concentrações de IB. O extrato 1259, obtido dos órgãos aéreos de *Piper* sp., Piperaceae, apresenta atividade intermediária, pois age como bactericida apenas na concentração de 5 mg/mL na menor concentração de IB e a partir da concentração de IB de 10^4 UFC/mL já necessita da maior concentração de extrato para eliminar as bactérias. As concentrações bactericidas mínimas do extrato 1298, obtido do caule de *Ocotea myriantha*, família Lauraceae, apresentaram-se constantes (0,6 mg/mL) em todas as concentrações de IB estudadas. Embora a concentração não seja tão baixa, a eficácia de sua atividade não pode ser desconsiderada sem que haja ensaios futuros relativos ao fracionamento e análise antibacteriana das frações. Análise parecida ocorreu com a atividade bactericida do extrato 1389, obtido do caule da espécie *Moronobea coccinea*, família Clusiaceae. O extrato 1395, oriundo das folhas de *Hymenaea parvifolia*, família Fabaceae Caesalpinioideae, apresentou ótima atividade bactericida nas concentrações de IB de 10^2 a 10^6 UFC/mL, e pode ser considerado um extrato com boas perspectivas de estudo, uma vez que, mesmo na maior concentração de IB, sua atividade pode ser considerada intermediária. O extrato 1497, obtido dos órgãos aéreos da espécie *Sorocea duckei*, família Moraceae, possui uma excelente atividade bactericida até a concentração de IB de 10^5 UFC/mL, porém, nas duas maiores concentrações de IB, passa a apresentar atividade apenas em concentrações de extrato mais elevadas. O extrato 1525, obtido de *Connarus ruber* var. *ruber*, Connaraceae, apresentou atividade bactericida intermediária em todas as concentrações de IB. Atividade semelhante foi observada para o extrato 1549, obtido de órgãos aéreos de *Combretum rotundifolium*, Combretaceae, apresentou ótima atividade bactericida (em torno de 0,6 mg/mL) nas concentrações de IB de 10^2 a 10^5 UFC/mL, enquanto que nas últimas duas concentrações, os valores da concentração de extrato aumentam um pouco, para 1,3 mg/mL. O extrato 1637, obtido de órgãos aéreos de *diclinanona calycina*, Annonaceae, apresentou atividade expressiva nas duas concentrações de IB mais baixas, ao passo que lentamente o valor da concentração sobe para 0,2, depois para 0,6 mg/mL, perdendo a atividade significativa nas últimas duas concentrações, quando observa-se que, para eliminar 10^6 UFC/mL de bactérias já há a necessidade de 5,0 mg/mL, e 12,5 mg/mL para a concentração mais alta testada. O extrato 1743, oriundo de órgãos aéreos de *Connarus* cf. *ruber* var. *ruber*, Connaraceae, apresenta uma atividade intermediária em todas as concentrações de IB testadas. O extrato 1905, feito a partir de caule de *Simphonia globulifera*, Clusiaceae, apresenta

atividade bactericida nas duas primeiras concentrações de IB, que rapidamente perdem a eficácia com o aumento da quantidade de bactérias, e já na concentração de 10^6 UFC/mL, a atividade bactericida não é alcançada mais pela maior concentração de extrato testada, de 12,5 mg/mL. Os extratos 1923, obtidos dos órgãos aéreos de *Vatairea guianensis*, Fabaceae Faboideae, e 1991, obtido dos órgãos aéreos de *Simphonia globulifera*, Clusiaceae, apresentam um comportamento similar, no qual a atividade bactericida aparece com relativa significância nas concentrações bactericidas mais baixas, e nas mais altas, a atividade bactericida aparece frente a uma concentração de extrato de 5,0 mg/mL. O extrato 1999, obtido dos órgãos aéreos da espécie *Iryanthera laevis*, família Myrsinaceae, apresenta baixa atividade bactericida e já na concentração de 10^5 UFC/mL há a ineficácia de atividade do extrato em sua maior concentração. Os extratos 1373, 1461 e, 1543 não apresentaram atividade bactericida significativa.

A análise da concentração inibitória mínima (CIM) dos 25 extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foi feita a partir dos ensaios feitos empregando-se o método de microdiluição em caldo, nas concentrações de suspensões bacterianas de 10^2 a 10^7 UFC/mL.

Foram encontrados 15 extratos dentre os 25 efetivos que apresentaram CIM nas concentrações de suspensões bacterianas de 10^2 UFC/mL iguais ou inferiores a 300 µg/mL. Enquanto nas suspensões bacterianas de 10^3 a 10^7 UFC/mL observou-se respectivamente, 10, 8, 9, 5 e 3, iguais ou inferiores a 300 µg/mL. Estes resultados são potencialmente importantes para estudar a atividade fitoquímica destes extratos.

Os 15 extratos que apresentaram CIM inferior a 300 µg/mL na concentração de IB correspondente a 10^2 UFC/mL, são 321, 429, 841, 1257, 1395, 1493, 1497, 1549, 1637, 1765, 1905, 1923, 1991 e 1999; correspondente a 10^3 UFC/mL, são 429, 1257, 1389, 1395, 1493, 1497, 1637, 1765, 1905 e 1991; correspondente a 10^4 UFC/mL, 841, 1257, 1395, 1493, 1497, 1637 e 1991; correspondente a 10^5 UFC/mL, 841, 1257, 1395, 1493, 1497, 1549, 1637, 1765 e 1991; correspondente a 10^6 UFC/mL, 1257, 1395, 1493, 1637 e 1765; e correspondente a 10^7 UFC/mL, 1257, 1493 e 1765.

Os extratos 1257, 1493, e 1765 foram os que apresentam melhores resultados relativos à CBM. O extrato 1257 apresentou CIM na concentração de 10^2 UFC/mL entre 40 e 200 µg/mL e nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7

UFC/mL, entre 200 e 300 µg/mL. O extrato 1493, apresentou CIM nas suspensões bacterianas de 10^2 a 10^7 UFC/mL < 40 µg/mL. Da mesma forma, o extrato 1765 apresentou CIM nas concentrações de IB de 10^2 e 10^4 UFC/mL entre 40 e 80 µg/mL, na concentração de 10^6 UFC/mL entre 80 e 200 µg/mL e em 10^7 entre 200 e 300 µg/mL.

Analisando a faixa de concentração de extratos entre 0,30 a 5,0 mg/mL, foi verificado que oito extratos dentre os 25 apresentaram CIM nesta faixa, na concentração de IB correspondente a 10^2 UFC/mL. Nas outras concentrações, o número de extratos cujos valores de CIM encontravam-se nesta faixa foi de 11, 13, 7, 9 e 8, nas concentrações de IB de 10^3 a 10^7 UFC/mL, distribuídos como segue: na concentração de IB de 10^2 UFC/mL são os extratos 55, 1247, 1259, 1298, 1373, 1389, 1525 e 1743; na concentração de IB de 10^3 UFC/mL são os extratos 55, 321, 352, 841, 1247, 1298, 1525, 1549, 1743, 1923 e 1999; na concentração de IB de 10^4 UFC/mL são os extratos 55, 321, 352, 429, 1247, 1298, 1389, 1525, 1549, 1743, 1905, 1923 e 1999; na concentração de IB de 10^5 UFC/mL são os extratos 352, 1298, 1389, 1525, 1743, 1905 e 1923; na concentração de IB de 10^6 UFC/mL são os extratos 55, 352, 841, 1298, 1525, 1549, 1743, 1923 e 1991; por fim, na concentração de IB de 10^7 UFC/mL são os extratos 841, 1298, 1395, 1525, 1549, 1743, 1923 e 1991.

Na última faixa de atividade, que parte de valores $\geq 5,0$ mg até o valor de 12,5 mg/mL, que pode ser considerada a que agrega os extratos, a princípio, menos potentes, observa-se 1, 4, 4, 9, 11 e 14 extratos nas diferentes concentrações de IB usadas. Nas concentração de 10^2 a 10^7 UFC/mL observa-se o extrato 1461; na concentração de IB de 10^3 UFC/mL, os extratos 1259, 1373, 1461 e 1543; na concentração de IB de 10^4 UFC/mL, os extratos 1259, 1373, 1461 e 1543; 10^5 UFC/mL, 55, 321, 429, 1247, 1259, 1373, 1461, 1543 e 1999; na concentração de IB de 10^6 UFC/mL, os extratos 321, 429, 1247, 1259, 1373, 1389, 1461, 1497, 1543, 1905 e 1999; e, por fim, na concentração de IB de 10^7 UFC/mL, os extratos 55, 321, 352, 429, 1247, 1259, 1373, 1389, 1461, 1497, 1543, 1637, 1905 e 1999.

Os 25 extratos selecionados com atividade contra *E. faecalis* pertencem a 15 diferentes famílias e a 21 gêneros diferentes. Seis extratos ativos foram obtidos de plantas que pertencem à família Clusiaceae, quatro, de plantas que pertencem à família Fabaceae e suas três sub-famílias, dois extratos, obtidos de plantas que pertencem à família Myrtaceae e extratos feitos com plantas pertencentes a cada

uma das outras famílias é representada por apenas 1 extrato ativo. Dentro da família Clusiaceae, observamos que os extratos 1389 e 1765 foram obtidos da mesma planta, na mesma data, e o extrato 1765, feito das flores da espécie, é um dos extratos mais ativos encontrados nessa pesquisa. O extrato 1389, feito a partir do caule, apresenta uma atividade intermediária. Ainda dentro da família Clusiaceae, os extratos 1905 e 1991, obtidos a partir do caule e dos órgãos aéreos da planta, respectivamente, apresentaram atividade relativamente parecida, sendo que o extrato 1991 é relativamente mais ativo que o outro. Como o extrato 1991 foi obtido a partir de órgãos aéreos e o extrato 1905 foi obtido somente do caule, fica evidente que os compostos responsáveis pela atividade encontram-se não somente no caule, mas disperso pelos órgãos aéreos que compuseram a coleta de material vegetal para o extrato 1991. Os extratos 321 e 1247 foram obtidos da mesma espécie, porém, foram coletados em épocas diferentes e a coleta foi feita com órgãos diferentes. O extrato 321 foi obtido de flores e folhas, enquanto o extrato 1247 foi obtido de órgãos aéreos. Estas diferenças proporcionaram diferenças sutis, não muito significantes, em termos da atividade no modelo da MDC. O extrato 321 é levemente mais ativo que o extrato 1247 nas concentrações do inóculo bacteriano mais baixas, mas a partir do inóculo concentrado em 10^5 UFC/mL, os dois extratos perdem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano de modo eficaz.

6.4 Análise comparativa inicial da atividade antimicrobiana feita com os dois modelos, disco difusão em ágar e microdiluição em caldo

Em ordem de maior atividade para menor atividade, foi observado que no modelo de DDA, os extratos mais ativos foram 1991, 1493, 1525 e 1257, enquanto que no modelo da MDC os extratos mais ativos foram o 1493, 1765 e 1257. Os extratos 1493 e 1257 são, sem dúvida, os dois que apresentam maior potencial para serem estudados detalhadamente. Porém, os extratos 1765 e 1525 devem ser olhados com atenção, uma vez que apresentaram valores de inibição de crescimento, cada um em seu modelo, significantes. Estes dois modelos oferecem sensibilidades diferentes, em função da capacidade que as substâncias em análise podem se difundir melhor no modelo feito em meio caldo. Por outro lado, na análise

realizada em meio ágar, os extratos são testados em concentrações maiores que no modelo MDC. Isto deve ser levado em consideração na análise da atividade antimicrobiana feita no modelo em ágar para que a análise dos dados finais não leve a erros de interpretação.

6.5 Análise dos resíduos originados dos 25 extratos em ambos os modelos antimicrobianos adotados

Cada extrato foi submetido à partição líquido-líquido e desta técnica, três resíduos foram obtidos, um resíduo clorofórmico, um resíduo butanólico e um resíduo aquoso, que foram analisados em dose única nos dois modelos, DDA e MDC. Os resultados observados foram os seguintes: no modelo DDA, a atividade bactericida observada no modelo DDA ficou restrita ao resíduo butanólico, enquanto que para o modelo MDC, a atividade se concentrou no resíduo aquoso. A atividade no modelo DDA do extrato 321 ficou dispersa nos três resíduos, enquanto que no modelo MDC a atividade ficou restrita ao resíduo aquoso. O extrato 352 teve a atividade concentrada no resíduo aquoso, no modelo MDC, enquanto que no modelo DDA a atividade ficou nos resíduos butanólico e aquoso. O extrato 429 perdeu a atividade quando fracionado, nos dois modelos. Os três resíduos do extrato 841 apresentaram atividade nos dois modelos usados. O mesmo foi observado para o extrato 1247. No modelo DDA, a atividade dos resíduos do extrato 1257 ficou dispersa entre os três, e no modelo MDC, a atividade se concentrou nos resíduos butanólico e aquoso. Os resíduos do extrato 1259 que apresentaram atividade no modelo DDA foram o clorofórmico e o butanólico, ao passo que perderam atividade no modelo MDC. Todos os resíduos do extrato 1298 apresentaram atividade no modelo DDA, enquanto que a atividade se concentrou no extrato aquoso, no modelo MDC. No modelo DDA, os resíduos butanólico e aquoso do extrato 1373 apresentaram atividade, enquanto todos perderam a atividade no modelo MDC. Os três resíduos do extrato 1389 apresentaram atividade no modelo DDA, enquanto que somente o extrato aquoso apresentou atividade, no modelo MDC. Ambos os resíduos butanólicos dos extratos 1395 e 1461 apresentaram atividade no modelo DDA, enquanto que o resíduo aquoso do extrato 1395 e os resíduos butanólico e

aquoso do 1461 apresentaram atividade no modelo MDC. A atividade bacteriana foi observada nos resíduos clorofórmico e butanólico do extrato 1493 no modelo DDA, e o resíduo clorofórmico apresentou atividade também no modelo MDC. No modelo DDA, os resíduos clorofórmico e butanólico do extrato 1497 apresentaram atividade antibacteriana, enquanto que a atividade antibacteriana não foi observada em nenhum resíduo deste extrato no modelo MDC. Os resíduos butanólico e aquoso do extrato 1525 apresentaram atividade antibacteriana tanto no modelo DDA como no MDC. O extrato 1543, quando fracionado, perdeu atividade. Os resíduos clorofórmicos dos extratos 1549 e 1637 apresentaram atividade no modelo DDA, enquanto que perderam a atividade no modelo MDC. O resíduo butanólico do extrato 1743 apresentou atividade no modelo DDA, e todos os resíduos apresentaram atividade no modelo MDC. A atividade antibacteriana ficou evidente nos resíduos clorofórmico e butanólico do extrato 1765, enquanto que perderam atividade no modelo MDC. Todos os resíduos do extrato 1905 apresentaram atividade no modelo DDA, enquanto que perderam atividade no modelo MDC. Os resíduos clorofórmico e butanólico do extrato 1923 apresentaram atividade no modelo DDA e perderam atividade no modelo MDC. Os três resíduos do extrato 1991 apresentaram atividade antibacteriana no modelo DDA, enquanto que a atividade antibacteriana se concentrou no resíduo aquoso no modelo MDC. Por fim, os resíduos butanólico e aquoso apresentaram atividade no modelo DDA, e a atividade se concentrou no resíduo butanólico no modelo MDC.

6.6 Análise das substâncias padrão nos dois modelos biológicos selecionados

A análise das duas substâncias padrão selecionadas, no modelo de microdiluição em caldo, feita em todas as concentrações de inóculo bacteriano, nas diferentes concentrações usualmente empregadas em Odontologia, resultou na atividade bactericida do hipoclorito de sódio 1% manipulado em todas as concentrações bacterianas testadas. Diferenças relativas à atividade antimicrobiana encontrada em soluções de origens diversas podem estar relacionadas à instabilidade do hipoclorito de sódio. A concentração inicial do cloro presente nas soluções de hipoclorito de sódio comercializadas pode ser alterada devido à

temperatura, às características de armazenamento, acondicionamento e até à distribuição das soluções (PÉCORA et al. 1987, PAIVA et al. 1989, SIQUEIRA, 2000, OLIVEIRA; FIGUEIREDO; PIRES, 2003). Siqueira (2000) relata em seu estudo que o pH e a temperatura influenciam no teor de cloro, uma vez que o hipoclorito de sódio 0,5% mantido sob refrigeração em pH 9 apresenta maior estabilidade do que as outras soluções analisadas, sugerindo aos Cirurgiões Dentistas o cuidado no armazenamento. Estes fatos podem estar relacionados à baixa eficácia encontrada nas soluções comercializadas testadas no MDC.

Os resultados observados para a clorexidina apontam atividade bactericida para as soluções manipuladas 1% e 2%, sendo que a solução de 1% não inibiu o crescimento bacteriano nas concentrações bacterianas maiores, de 10^6 e 10^7 UFC/mL. A solução comercializada de clorexidina 1% apresentou a mesma atividade observada para a solução manipulada. Por causa de problemas práticos de diluição, não foi possível testar algumas das concentrações de hipoclorito de sódio e de clorexidina.

6.7 Análise da literatura dos compostos químicos e atividade biológica que ocorrem nas espécies selecionadas ou em alguma taxa superior

Esta análise da literatura irá ser feita com os extratos que mostraram maior potencial de atividade: extrato 1493 (*Ipomoea* sp., Convolvulaceae), 1257 (*Palicourea guianensis*, Rubiaceae), extrato e 1765 (*Moronobea coccinea*, Clusiaceae).

O extrato 1493 é oriundo dos órgãos aéreos de *Ipomoea* sp, da família das Convolvulaceae. Estudos apontam que espécies pertencentes a este gênero apresentam diferentes atividades biológicas. Molyneux *et al.* (1995) encontraram alcalóide nas sementes de uma espécie de *Ipomoea* sp. e relataram que esta planta é capaz de produzir inibidores de beta-glicosidade, alfa-mannosidase e alfa-galactosidase e conseqüentemente produzem desordens neurológicas quando consumidas por gado. Goun *et al.* 2003 encontraram atividade antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico de *Ipomoea* spp.

Tão *et al.* (2008) descrevem oito resinas glicosiladas encontradas no extrato etanólico da *Ipomoea pes-caprae*, que apresentaram atividade sobre células tumorais, atividade antibacteriana e antifúngica e efeito sobre receptor um-opioide. Escobedo-Martinez, Pereda-Miranda (2007) estudaram o extrato hexânico das partes aéreas da mesma espécie e verificaram seis oligosacarídeos. De- Souza *et al.* (2000) estudaram esta mesma espécie e verificaram a presença de esteróides, terpenos, alcalóides e flavonóides que, segundo os autores, fundamentaria o uso popular desta planta para tratamento de dor. A espécie *Ipomoea digitata* também apresentam resinas glicosiladas, segundo Ono *et al* (2009), que observaram sua presença bem como de diversos ácidos orgânicos, como isobutírico, metilbutírico, entre outros.

Em 1995, Reynolds *et al.* isolaram e caracterizaram três novos tetrassacarídeos glicosilados isolados de *Ipomoea stans* e verificaram pronunciada ação citotóxica contra três tumores humanos, bem como atividade antibacteriana. Herrera-Ruiz *et al.* 2007 estudaram a ação de *Ipomea stans* sedativa e anticonvulsiva do extrato de acetato de etila obtido das raízes da planta.

Ipomoea batatas é uma espécie muito estudada por ser de consumo humano. Apresenta resinas glicosiladas (Yin *et al* 2008), oligossacarídeos e pentasacarídeos (Escalante-Sanchez *et al* 2007 e 2008), compostos fenólicos com atividade quimiopreventiva (Kurata *et al* 2007) e antioxidante (DINI, TENORE, DINI 2006; STEED, TROUNG 2008).

O extrato metanólico obtido de *Ipomoea tyrianthina* apresentou atividade antimicobacteriana, citotóxica e efeitos no sistema nervoso central (LEÓN-RIVERA *et al.* 2008). O extratos metanólico de *Ipomoea obscura* apresentou atividade citotóxicas e imunobiomoduladoras (HANSA, KUTTAN 2008). *Ipomoea cairica* e *Ipomoea squamosa* apresentaram atividades citotóxica e anti-tumoral respectivamente (LIN, CHEN, LO 2008; CAO *et al.* 2007). *Ipomoea aquatica* reduz a absorção de glicose pelo intestino acelerando o trânsito do mesmo (SOKENG *et al.* 2007). O extrato clorofórmico de *Ipomoea intrapilosa* apresentou resinas glicosiladas (BAH *et al.* 2007).

Ipomoea muricata, *Ipomoea carnea*, *Ipomoea obscura*, *Ipomoea nil* *Ipomoea sericophylla* e *Ipomoea riedelii* apresentam alcalóides (HARAGUCHI *et al.* 2003; IKEDA *et al.* 2003; JENETT-SIEMS *et al.* 2003; SCHIMMING *et al.* 2005; BARBOSA *et al.* 2006; MAURYA, SRIVASTAVA 2009).

O extrato aquoso da *Ipomoea carnea* foi capaz de ultrapassar a barreira placentária e afetou o desenvolvimento fetal, o que deve ter sido causado pela presença de swainsonina, um alcalóide produzido pelos órgãos florais (de BALOGH *et al.* 1999; HUEZA *et al.* 2005 e 2007). Latorre, Hueza e Górnjak 2007 verificaram o mesmo efeito teratogênico do extrato aquoso da *Ipomoea carnea* testado em modelo animal.

A calistegina é um marcador quimiotaxômico encontrado nas Convolvaceae, em especial nas partes aéreas (flores e frutos) de espécies de *Ipomoea* (HARAGUCHI *et al.* 2003). Pereda-Miranda, Kaatz, Gibbons 2006 encontraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* em um estudo realizado com 22 Convolvaceae e atribuíram essa atividade provavelmente à presença de oligosacarídeos polisacarídeos.

Palicourea guianensis é uma planta pouquíssimo estudada em termos fitoquímicos e farmacológicos. Pertence a um gênero que possui algumas plantas extremamente estudadas, como a erva-de-rato (*P. marcgravii*), responsável por um número elevado de intoxicação bovina, que acaba impactando a agropecuária pela ferocidade da ação tóxica. O grupo de pesquisa de Palermo-Neto estudou em profundidade os efeitos desta planta sobre o sistema nervoso central, quanto à sua composição química e outros, entre os anos de 1986 e 1995. Observaram que os efeitos letais se estendem a animais de laboratório (GORNIK *et al.* 1986) e os comportamentos relacionados aos centros dopaminérgicos (GORNIK *et al.* 1990), observaram os efeitos tóxicos em roedores de diferentes frações (GORNIK *et al.* 1992a), observaram a relação entre a atividade neuronal e apreensão comportamental em ratos (GORNIK *et al.* 1992b), questionaram se o ácido monofluoracético era a substância responsável pela atividade tóxica (ECKSCHMIDT *et al.* 1993), confirmada posteriormente por Krebs *et al.* em 1994. Outros trabalhos foram feitos, de modo a acrescentarem ocorrências de outras classes químicas na espécie, como cafeína (GORNIK *et al.* 1986) e alcalóides glicosilados (MORITA *et al.* 1989).

O extrato 1765 foi obtido das flores e o 1389 do caule da *Moronebea coccinea*. É uma planta pouquíssimo estudada em termos fitoquímicos e farmacológicos. O extrato metanólico obtido do látex de *Moronebea coccinea* apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina e a atividade se deve, provavelmente a floroglucínóis (MARTI *et al.* 2008). Como poucos

estudos foram feitos com esta espécie, uma pesquisa referente à fitoquímica e farmacologia de espécies de Clusiaceae foi feita. Deste estudo, diversos autores relatam a presença de compostos fenólicos citotóxicos (LAPHOOKHIEO, MANEERAT, KOYSOMBOON 2009) e anti-tumorais (de MESQUITA *et al.* 2009). Na cavidade bucal, o gel contendo extrato do pericarpo de *Garcinia mangostana* L. apresentou atividade antibacteriana no tratamento periodontal (RASSAMEEMASMAUNG *et al.* 2008). Balunas *et al.* 2008 isolaram xantonas de *Garcinia mangostana* e apontaram que, quando utilizadas na alimentação, podem servir de agente quimiopreventivo do câncer. Segundo Obolskiv *et al.* 2009, a mesma espécie contém propriedades anti-inflamatórias atribuídas à presença de xantonas. Capettini *et al.* (2009) relatam que as xantonas presentes em Clusiaceae apresentaram atividade vasodilatadora e antioxidante independentes. O extrato metanólico obtido de *Calophyllum thwaitesii* apresentou atividade antifúngica e antioxidante, provavelmente devido à presença de xantonas (DHARMARATNE, NAPAGODA, TENNAKOON 2009)

Williams *et al.* (2005) relataram que *Garcinia macrophylla*, uma das espécies que apresentaram atividade antibacteriana no presente estudo, produzem benzofenonas e gutiferas e apresentam fraca atividade citotóxica.

A espécie *Tovomita longifolia* (correspondente ao extrato 1543) foi estudada por Suffredini *et al.* (2006a) contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e foi observado que apresentou atividade antibacteriana e citotóxica. Pecchio *et al.* (2006) realizaram estudos fitoquímicos com extratos clorofórmicos e etanólicos das folhas desta espécie e isolaram benzofenonas e avaliaram sua atividade contra células de tumores humanos *in vitro* e contra bactérias (*Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella gallinarum*).

Symphonia globulifera, que o presente estudo corresponde aos extratos 1905 e 1991, foi estudada por Lenta *et al.* (2007), que observaram atividade contra o parasita da leishmaniose e atividade anticolinesterásica provavelmente relacionadas à presença de benzofenonas e xantonas. Outros três trabalhos demonstraram ocorrência de xantonas (NGOUELA *et al.* 2005; NOGELA *et al.* 2006; NKENGFAK *et al.* 2002).

6.8 Análise da eficácia da partição líquido-líquido dos extratos e avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e frações

Os extratos e seus resíduos foram avaliados cromatograficamente, na técnica em camada delgada, utilizando-se três sistemas de solventes distintos e com polaridade crescente. Deste modo, a quantidade de manchas obtidas nos resíduos foi avaliada. Na avaliação, observa-se que os resíduos clorofórmicos apresentam boa separação com o sistema de solventes 1, mais apolar. Os outros dois resíduos apresentaram melhor separação nos outros dois sistemas de solventes (sistemas 2 e 3), uma vez que os compostos contidos nestes dois resíduos são de média polaridade no resíduo butanólico e polares, no aquoso.

6.9 Importância da identificação de novos agentes antibacterianos a partir de plantas brasileiras

A importância inerente à biodiversidade brasileira é traduzida no elevado número de espécies vegetais e animais contidos em suas florestas.

O Brasil é o país mais rico em termos de biodiversidade, é o local onde se encontra uma riqueza de espécies vegetais e animais como em nenhum outro do mundo. Pesquisas que buscam ampliar o entendimento da biodiversidade em termos dos compostos químicos que as plantas e animais apresentam são de vital importância, uma vez que desta riqueza de espécies, imagina-se que haja uma riqueza proporcional na biossíntese de compostos químicos. A Universidade Paulista implementou, há 12 anos, um centro de pesquisa em biodiversidade que visa ampliar os conhecimentos das espécies em termos fitoquímicos e farmacológicos. Para tanto, estabeleceu laboratórios equipados para analisar extratos vegetais obtidos de plantas da Amazônia e da Mata Atlântica em termos da atividade biológica contra células tumorais humanas e bactérias de importância na clínica odontológica e médica. Além disso, tem estabelecido parcerias para a realização dos ensaios fitoquímicos mais finos e tem realizado as técnicas fitoquímicas de bancada em seus laboratórios. Com isso, trabalhos tem sido desenvolvidos junto

aos cursos de Mestrado em Odontologia e Mestrado e Doutorado em Medicina Veterinária e tem auxiliado na formação de pesquisadores pela instituição. Trabalhos como este tem importância no que se refere à descoberta de substâncias com atividade biológica a partir de plantas, e abre um leque imenso de possibilidades de pesquisa, até a identificação de uma molécula que possa vir a se transformar em medicamento.

7 CONCLUSÃO

Vinte e cinco extratos vegetais foram testados em dois modelos antimicrobianos e resultaram em três extratos com atividade significativa: 1493 obtido de órgãos aeréos da *Ipomoea* sp., 1257 obtido de órgãos aeréos da *Palicourea guianensis* e 1765 obtido das flores da *Moronebea coccinea*.

Foram determinadas a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos vinte e cinco extratos, utilizando o ensaio de microdiluição em caldo. Os resultados mais significantes estão relacionados aos extratos 1493, 1257 e 1765.

Foram obtidos os resíduos clorofórmico, butanólico e aquoso dos vinte e cinco extratos, e foram avaliados quanto ao potencial antibacteriano nos modelos biológicos usados na avaliação dos extratos.

Foram obtidos cromatogramas analíticos para avaliação do processo de partição líquido-líquido adotado. Observou-se que os resíduos apresentaram comportamentos distintos frente aos sistemas de solvente selecionados, e que alguns apresentaram potencial antioxidante.

REFERÊNCIAS

ABDULLHAH, M. *et al.* Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **J. Endod.**, v. 31, p. 30-6, 2005.

ALDRICH, P.R. *et al.* Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Mol Ecol.** n.7, v.8, p.933-44. Aug.1998.

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L. *Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic.* **Science.** v.281, n.5373. p.103-5. Jul. 1998.

ALMYROUDI, A.; MCHUGHT, S.; SAUNDERS, W.P. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. **J. Endod.**, v. 28, n. 3, p. 163-7, mar. 2002.

ALVES, E.G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para a avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AMORIM, C.V.G. **Avaliação das concentrações inibitórias mínimas de digluconato de clorexidina e de paramonoclorofenol frente a alguns micro-organismos.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de São Paulo, São Paulo, 2000, p.120.

ARAUJO, C.R.F. *et al.* Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anacardium occidentale* Linn. sobre leveduras do gênero *Candida*. **Arq Odontol.**, v.41, n.3, p.193-272, jul./set., 2005.

ASHIMURA, T.; SATO, M.; HOSHINO, E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium limidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the polymerase chain reaction (PCR) method. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 463-470, 2001.

ASLANGUL, E. *et al.* Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.10, p.4144-4148, 2005.

BAH, M. *et al.* Intrapilosins I-VII, pentasaccharides from the seeds of *Ipomoea intrapilosa*. **J Nat Prod.** v.70, n.7, p.1153-7. Epub 2007 Jun 13. Jul.2007.

BALOGH, K.K. *et al.* A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **J Vet Diagn Invest.** v.11, n.3, p.266-73. May. 1999.

BALUNAS, M.J. *et al.* Xanthonenes from the botanical dietary supplement *mangosteen* (*Garcinia mangostana*) with aromatase inhibitory activity. **J Nat Prod.** v.71, n.7, p.:1161-6. Epub 2008 Jun 18. Jul., 2008.

BARBIN, E.L. **Estudo "in vitro" do efeito da adição de lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino.** Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. p.108, 1999.

BARBIN, E.L. Análise "in vitro" da variação térmica durante o uso do hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, com peróxido de hidrogênio a 3%. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 9, n. 3, p. 189-192, jul./set., 1995.

BARBOSA, A.R.; MEDEIROS, U.V. Correlação entre experiência de cárie em níveis salivares de *streptococcus* do grupo mutans em bebês de 3 a 6 meses. **RBO.** v.5, n.2, 2002.

BARBOSA, R.C. *et al.* Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon.** 15, v.47, n.4, p.371-9. Mar., 2006.

BASSANI, V.L.; GONZÁLES, O.G.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento Tecnológico de produtos fitoterápicos. **R. Fitos**, v. 1, p. 14-15, 2005.

BEVILACQUA, I.M.; HABITANTE, S.M.; CRUZ, C.W. A. clorexidina como alternativa no tratamento de infecções endodônticas: revisão da literatura. **R. Biociência**, v. 10, n. 3, p. 139-145, 2004.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.13, p.316-347, 2002.

BONACORSI, C.; RADDI, M.S.G.; CARLOS, I.Z. Citotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide inductions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 2, p. 207-12, 2004.

BONESVOLL, P.; GJERNO, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention salivary concentration and plaque - inhibiting effect in the human oral cavity. **J. Clin. Periodontol.**, v. 1, p. 214-21, 1974.

BORIN, G.; BECKER, N.A.; OLIVEIRA, E.P. M. A história do hipoclorito de sódio e a sua importância como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares. **R. Endod. Pesq. Ens. on-line**, n.5, p. 1-5, jan/jun., 2007.

BUCK, R.; ELEAZER, P.D.; STAAT, R. *In vitro* disinfection of dentinal tubules by various endodontic irrigants. **J. Endod.**, v. 25, n. 12, p. 7886-8, dec., 1999.

BUFFON, M.C.M. *et al.* Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo *in vitro*. **R. Visão Acad.**, Curitiba, v. 2, n. 1, p. 31-38, jan./jun., 2001.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int. Endod. J.**, v. 18, p. 35-40, 1985.

CAO, S. *et al.* Ipomoeassin F, a new cytotoxic macrocyclic glycoresin from the leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname rainforest. **Nat Prod Res.** v.21, n.10, p.872-6. Aug., 2007.

CAPETTINI, L.S. *et al.* Vasodilator and antioxidant effect of xanthenes isolated from Brazilian medicinal plants. **Planta Med.** Feb. v.75, n.2, p.145-8. Epub 2008 Dec., 17. 2009.

CHATTOPADHAYAY, D.; SINHA, B.K.; VAID, L.K. Antibacterial activity of syzygium species. **Fitoterapic. Milão**, v. 69, n. 4, p. 356-367, 1998.

CHÉRIGO, L. *et al.* Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. **J Nat Prod.** v.71, n.6, p.1037-45. Epub 2008 May 24. Jun., 2008.

CIMANGA, K. *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the democratic republic of congo. **J. of Ethnoph.** Limerick., v. 79, n. 2, p. 213-220, feb., 2002.

CORVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infection Disease**. v.42, p.25-34, 2006.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology review**, v. 12, n. 4, p. 564-582, oct., 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAM D.J.; SNADER K.M. Natural products in drug Discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52-60, 1997

CURTIS, H.J.; MYERS, J.L. Failure to find intercellular protoplasmic continuity in *Griffithsia globulifera*. **Biol Bull**. v.99, n.2, p.350-1. Oct., 1950.

DAMETTO, F.R. *et al.* *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, p. 768-72, 2005.

DAVIES, A. The mode of action of chlorhexidine. **J. Periodontal. Res.**, v. 8, n. 12, p. 68-75, 1973.

DEGEN, B.; BANDO, E.; CARON, H.I. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. **Heredity**. v.93, n.6, p.585-91. Dec., 2004.

DEGEN, B. *et al.* Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. **Heredity**. v.87n.4, p.497-507. Oct., 2001.

DELANY, G.M. *et al.* The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Med. Oral Pathol. Radiol. Endod.**, v. 53, n. 5, p. 518-23, may., 1982.

DESHAPANDE, L.M. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.58, p.163-170, 2007.

DHARMARATNE, H.R.; NAPAGODA, M.T.; TENNAKOON, S.B. Xanthones from roots of *Calophyllum thwaitesii* and their bioactivity. **Nat Prod Res**. v.23, n.6, p.539-45. 2009.

DICK, C.W.; ABDUL-SALIM, K.; BERMINGHAM, E. Molecular systematic analysis reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. **Am Nat.** v.162, n.6, p.691-703. Epub 2003 Nov 4. Dec., 2003.

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. New polyphenol derivative in *Ipomoea batatas* tubers and its antioxidant activity. **J Agric Food Chem.** v.54, n.23, p.8733-7. Nov. 15, 2006.

DOSSIÊ MATA ATLÂNTICA. **Projeto monitoramento participativo da Mata Atlântica.** Capobianco, J.P.R. Editor: Instituto Socioambiental, Recife de ONGs Mata Atlântica, Sociedade Nordestina de Ecologia. Ipsis, São Paulo, SP, Brasil. 2001.

DUGGAN, J.M.; SEDGLEY, C.M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v. 33, p.815-8, 2007.

ECKSCHMIDT, M.; Brizolla, M.; Tarraga, D.P.; Palermo-Neto, J. Is monofluoroacetic acid the active neurotoxic principle in *Palicourea marcgravii* (St. Hill) leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.22, n.8, p.975-7, 1989.

EMILSON, C. G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 85, n. 4, p. 255-265, may, 1977.

EREN, K.; ÖZMERİÇ, N.; SARDAS, S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. **Clin. Oral Invest.**, v. 6, p. 150-4, 2002.

ESCALANTE-SÁNCHEZ, E. *et al.* Batatinosides II-VI, acylated lipooligosaccharides from the resin glycosides of sweet potato. **J Agric Food Chem.** v.56, n.20, p.9423-8. Epub 2008 Sep 25. Oct 22., 2008.

ESCALANTE-SÁNCHEZ, E.; PEREDA-MIRANDA, R. Batatins I and II, ester-type dimers of acylated pentasaccharides from the resin glycosides of sweet potato. **J Nat Prod.** v.70, n.6, p.1029-34. Epub 2007 May 9. Jun., 2007.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; PEREDA-MIRANDA, R. Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. **J Nat Prod.** v.70, n.6, p.974-8. Epub 2007 May 19. Jun., 2007.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORÁ, J.D. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. **J Appl Oral Sci.**, v.11, n.2, p.133-137, 2003a.

ESTRELA, C. *et al.* Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J. Endod.**, v. 25, n. 6, p. 416-418, 1999.

ESTRELA, C. *et al.* Antimicrobial effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorhexidine Tested by different Methods. **Braz Dent J** ., v.14, n.1, p.58-62, 2003b.

ESTRELA, C. *et al.* Eficácia antimicrobiana de formulações de digluconato de clorexidina de concentrações e procedências diferentes. **ROBRAC.**, v. 13, n. 35, p. 10-3, 2004.

ESTRELA, C. *et al.* Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* – A systematic review. **J Appl Oral Sci.**, v.16, n.6, p.364-8, 2008.

ESTRELA, C. *et al.* A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J Appl Oral Sci.** v.17, n.2, p.87-91, 2009.

ESTRELA, C.R.A. **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares.** Tese (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Goiás – Goiânia, Goiás. 2000.

EUROPEAN SOCIETY OF ENDODONTOLOGY. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. **Int. Endod. J.**, v. 39, p. 921-30, 2006.

EVANS, M. *et al.* Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 221-8, 2002.

EVANS, M. *et al.* Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 221-8, 2005.

EVANS, M. *et al.* Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as a intracanal medication in bovine dentin. **J. Endod.**, v. 29, n. 5, p. 238-239, 2003.

FACHIN, E.V.F.; HAHN, L.; PALMINI, A.L.F. Revisão e enfoque clínico sobre o uso do hipoclorito de sódio em endodontia. **R. Bras. Odontol.**, v. 51, n. 6, p. 14-18, nov./dez., 1994.

FACKLAM, R.; SAHM, D.A.; TEIXEIRA, L.M. **Enterococcus**. In: MURRAY, P.R. *et al.* (ed) - Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, American Society for Microbiology, p. 297-305. 1999.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2ªEd. São Paulo: Siqueira, 1959. 829 p.

FELIPPE, W.T.; SOARES, I.J.; MALLMANN, J. Avaliação da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos a três substâncias utilizadas na irrigação de canais radiculares. **Revista Odonto Ciência.**, v. 20, n. 2, p. 47-54, 1995.

FERRARI, P.H.P.; CAI, S.; BOMBANA, A.C. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 38, p. 372-80, 2005.

FERRAZ, C.C.R. *et al.* **Avaliação *in vitro* do gel de clorexidina como irrigante endodôntico**. In: Reunião da SBPqO 2000; 17, resumo A357.

FERREIRA, F.B.A. **Estudo *in vitro* do efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis e de outros medicamentos usados em endodontia sobre microorganismos anaeróbios**. Tese (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999.

FRANÇA, V.C. *et al.* Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **R. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 326-330, out./dez., 2005.

FURTADO, G.H.C. *et al.* Incidência de Enterococcus resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Rev Saúde Public.** v.39, n.1, p.41-6, 2005.

GAETTI JARDIM JUNIOR, E. *et al.* Influência do preparo biomecânico sobre a microbiota presente no interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica. **R. Odont. Braz.**, v. 7, n. 2, p.83-91, abr./jun., 2001.

GENTIL, M. *et al.* ***In vitro* evaluation of the antibacterial activity of Arctium lappa as a phytherapeutic agent used in intracanal dressing**. **Phytother Res.**, v. 20, n. 3, p. 184-6, 2006.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Illex paraguariensis* A. St. Hill. (erva mate) frente as bactérias zoonóticas em saúde e produção animal.** 71p. Dissertação de Mestrado. PPGCVI Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

GOMES, B.P. *et al.* *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 102, n. 2, p. 247-53, 2006.

GOMES, B.P.F.A. *et al.* **In vitro** antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and clorexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J.**, v.34, p.424-9, 2001.

GORNIAC, S.L. *et al.* Chromatographic isolation of caffeine from *Palicourea marcgravii*. **Veterinary and human toxicology**, v.28, n.6, p. 542, 1986.

GORNIAC, S.L. *et al.* *Palicourea marcgravii* intoxication in rats: effects of different fractions. **Veterinary and human toxicology.**, v.34, n.3, p. 216-8, 1992a.

GORNIAC, S.L. *et al.* The relationships between neuronal activity and behavioral seizures induced by *Palicourea marcgravii* in rats. **Veterinary and human toxicology.**, v.34,n.5, p.401-2, 1992b.

GORNIAC, S.L. *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immuno.**, v. 19, n. 2, p. 71-76, 2004.

GORNIAC, S.L. *et al.* Effectiveness of 2% clorexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **Int. Endod. J.**, v. 36, p. 267-75, 2003.

GORNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J.; DE SOUZA-SPINOSA, H. Effects of a *Palicourea marcgravii* leaf extract on some dopamine-related behaviors of rats. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.28, n.3, p. 329-35, 1990.

GORNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J.; DE SOUZA-SPINOSA, H. Effects of *Palicourea marcgravii* on laboratory. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.25, n.2, p.221-6, 1989.

GOULD, C.V. *et al.* Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcus bacteremia: impact of prior fluoroquinolone use? **Infection Control and Hospital Epidemiology**. V.25, p.138-145, 2004.

GOUN, E. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**. v.74, n.6, p.592-6. Sep., 2003.

GREENSTEIN, G.; BERMAN, C.; JAFFIN, R. Chlorexidine. An adjunct to periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 57, n. 6, p. 370-7, jun.1986.

GUERESOLI, D.M.Z; SOUZA NETO, M.D.; PÉCOR, J.D. Ação do hipoclorito em diversas concentrações sobre a estrutura dentinária. **R. Odont. UNAERP**, v. 1, n. 1, p. 7-11, 1998.

GUIMARÃES, C.C.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina e do paramonofenol em diferentes veículos**. Tese. [Dissertação de Mestrado.] Universidade de São Paulo, SP, 140p. 2001.

HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 8, p. 1375-1379, 1987.

HAMSA, T.P.; KUTTAN, G. *Ipomoea Obscura* (L.) Enhances the Functions of Immunological Effector Cells, Inhibits Proinflammatory Cytokines and Nitric Oxide Production by LPS Induced Macrophages. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v.16, p.1-15. Sep., 2008.

HANCOCK, H.H. *et al.* Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. and Endod.**, v. 91, p. 579-86, 2001.

HARAGUCHI, M. *et al.* Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **J Agric Food Chem**. v.51, n.17, p.4995-5000. Aug., 2003.

HASHIMURA, T.; SATO, M.; HOSHINO, E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium limidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the polymerase chain reaction (PCR) method. **Int Endod J**. v.34, p.463-470, 2001.

HAYS, G.L.; JANER, L.R.; WHITE, R.R. Quantification of antimicrobial activity remaining in chlorhexidine-treated root canals. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 2, 1976.

HELING, I. *et al.* Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. **Int. Endod. J.**, v.25, n. 1, p. 15-9, jan. 1992.

HELING, I. *et al.* Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. **J. Endodon.**, v. 27, n. 4, p. 278-80, 2001.

HENNESSEY, T.S. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J. Periodontol.**, v. 12, p. 61-7, 1973.

HERRERA-RUIZ, M. *et al.* Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from *Ipomoea stans* roots. **J Ethnopharmacol.**, Jun 13;112(2):243-7. Epub 2007 Mar 7. 2007.

HIKIBA, H. *et al.* Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian Hamster Embryo cells. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 97, p. 146-52, 2005.

HIZATUGU, R. *et al.* **Etiopatogenia das doenças endodônticas.** Endodontia em sessão única, mito ou realidade? São Paulo: Atheneu, v. 2. Cap.2, p.7-22, 2002.

HORGEN, F.D. *et al.* Biological screening of rain forest plot trees from *Palawan Island* (Philippines). **Phytomedicine.**, v.8, n.1, p.71-81. Jan., 2001.

HORNER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab.** v.41, n.6, p.391-5, 2005.

HUEZA, I.M. *et al.* Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of *Ipomoea carnea* in rats. **Exp Toxicol Pathol.** v.58, n.6, p.439-46. Epub 2007 Apr 6. Aug., 2007.

HUEZA, I.M. *et al.* The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. **Exp Toxicol Pathol.** v.7, n.1, p.53-8. Aug., 2005.

HUGO, W.B.; LONGWORTH, A.R. The effect of chlorhexidine on electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus mutans*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 18, p. 569-84, 1996.

IKEDA, K. *et al.* Alkaloids from the poisonous plant *Ipomoea carnea*: effects on intracellular lysosomal glycosidase activities in human lymphoblast cultures. **J Agric Food Chem.** v.51, n.26, p.7642-6. Dec. 17, 2003.

ISLAM, M.S. *et al.* Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. **J Agric Food Chem.** v.50, n.13, p.3718-22. Jun 19., 2002.

ISSI, I.V.; PANKOVA, T.F. New species of microsporidian *Issia globulifera* sp. n. (Nosematidae) in the malarial mosquito *Anopheles maculipennis*. Article in Russian. **Parazitologija.** v.17, n.3, p.189-94. May/Jun., 1983.

ISSI, I.V.; PANKOVA, T.F. Refinement of the diagnosis of *Issia globifera* (Microsporidia: nosematidae) based on ultrastructural data. Article in Russian. **Sokolova Iula. Parazitologija.** v.35, n.2, p.165-8. Mar/Apr., 2001.

JEANSONNE, M.J.; WHITE, R.R.A. Comparison of 2% clorexidine gluconate and 5,25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **J. Endod.**, v. 20, n. 6, p. 276-8, jun. 1994./

JENETT-SIEMS, K. *et al.* Ipobscurines C and D: macrolactam-type indole alkaloids from the seeds of *Ipomoea obscura*. **Phytochemistry.** v.62, n.8, p.1257-63. Apr., 2003.

JOHNSON, E.M.; FLANNAGAN, S.E.; SEDGLEY, C.M. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. **J Endod.** v.32, p.946-950, 2006.

JUNG, II-Y. *et al.* Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **J. Endod.**, v. 26, p. 599-604, 2000.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in ger-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg.**, v. 20, p. 340-349, 1965.

KALIL, M.V. *et al.* **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade da solução de clorexidina 2% em cultivo de células Hep-2.** *In:* Reunião da SBPqO 2000; 17, resumo B334.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulência factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.15, n.5, p.308-320, 2004.

KJAERHEIM, V. *et al.* Effects of triclosan on the rat phrenic nervediaphragm preparation. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, n. 6, p. 488-98, 1994.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. **Diagnóstico microbiológico.** Texto e Atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p.589-659.

KREBS, H.C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by ¹⁹F-NMR spectroscopy. **Toxicon.**, v.32, n.8, p.909-13, 1994.

KRISTICH, A.J. *et al.* Esp-Independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **J. of Bacteriol.**, v. 186, n. 1, p. 154-163, 2004.

KUBOTA, K.Y.D.; OHARA, M.T.; BACCHI, E.M. Determinação do valor de concentração mínima inibitória de tinturas vegetais pelo método de diluição em meio líquido utilizando microplacas. **Revista Lecta**, v.19, p. 35-40, 2001.

KURATA, R. *et al.* Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. **J Agric Food Chem.** v.55, n.1, p.185-90. Jan 10., 2007.

LANA, M.A. *et al.* Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 16, p. 100-5, 2001.

LANG, N.P.; GROSSMAN, K.R. Optimal dosage of chlorhexidine digluconate in clinical plaque control when applied by one irrigator. **J. Clin. Periodontol.**, v. 8, n. 3, p. 189-202, 1981.

LANSKY, E.; SHUBERT, S.; NEEMAN, I. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. **Options Mediterranennes**, Israel, p. 231-235, 2004.

LAPHOOKHIEO, S.; MANEERAT, W.; KOYSOMBOON, S. Antimalarial and cytotoxic phenolic compounds from *Cratoxylum maingayi* and *Cratoxylum cochinchinense*. **Molecules.** v.14, n.4, p.1389-95. Mar., 2009.

LATORRE, A.O.; HUEZA, I.M.; GÓRNIAK, S.L. Association of Ipomoea carnea and BCG reduces birth defects caused by cyclophosphamide in rats. **Life Sci.** v.80, n.5, p.430-5. Epub 2006 Oct 5. Jan 9., 2007.

LEME, I.L., FERREIRA, A.J.P. **Enterococcus**. In: FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. 2ª Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001, p.132-146.

LENET, B.J. *et al.* Antimicrobial substantivity of bovineroot dentin exposed to different chlorexidine deliveryvehicles. **J. Endod.**, v. 26, n. 11, p. 652-5, nov. 2000.

LENET, B.J. *et al.* Colonization of E. faecalis in root canal bovine dentin treated with different chlorexidine formulations. **J. Endod.**, v. 25, n. 4, p. 289, apr. 1999.

LENTA, B. N. *et al.* *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** v.111, n.1, p.8-12. Apr., 2007.

LENTA, B.N. *et al.* Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from Allanblackia monticola and Symphonia globulifera. **Molecules.** v.12, n.8, p.1548-57. Jul., 2007.

Dick CW, Heuertz M. The complex biogeographic history of widespread tropical tree species. **Evolution.** v.62, n.11, p.2760-74. Nov., 2008.

LEÓN-RIVERA, I. *et al.* Tyrianthnic acids from Ipomoea tyrianthina and their antimycobacterial activity, cytotoxicity, and effects on the central nervous system. **J Nat Prod.** v.71, n.10, p.1686-91. Oct., 2008.

LEONARDO, M.R. *et al.* *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in Endodontics. **J. Endod.**, v. 26, n. 7, p. 91-394, 2000.

LI, X.C. *et al.* Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies. **J Nat Prod.** v.65, n.12, p.1909-14. Dec., 2002.

LIMA-JUNIOR, J.F. *et al.* O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. **Saúde em Revista,** v.7, n.16, p.11-17, 2005.

LIN, R.J.; CHEN, C.Y.; LO, W.L. Cytotoxic activity of Ipomoea cairica. **Nat Prod Res.** v.22, n.9, p.747-53. Jun., 2008.

LOPES, H.P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.F. **Microbiologia Endodôntica.** In: Endodontia, Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, cap. 10, p.185-216.

LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. **Microbiologia das infecções pulpares e periapicais.** In: Microbiologia para o estudante de Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 11, p. 163-174.

LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. **Componentes bacterianos da microbiota bucal.** In: Microbiologia para o estudante de Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 3, p. 33-42.

LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. **Métodos de estudo em microbiologia oral.** In: Microbiologia para o estudante de Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 4, p.43-54.

LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. **Microbiologia para o estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. p.274.

LOVE, M. R. Enterococcus faecalis a mechanism for its role in endodontic failure. **Int .Endod. J.**, v. 36, p. 1-11, 2001.

MACHADO JUNIOR, J.A.; NASCIMENTO, C.M.O.; MACHADO, M.F.C. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias utilizadas como soluções irrigadoras de canais radiculares. **R. Odontol. Univ. Santo Amaro.**, v.6, n.1, p. 54-60, jan. 2001.

MACHADO, W.A.S. *et al.* Reação tecidual ao implante de um dispositivo de liberação lenta (Periochip) em dorso de rato albino. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 59, n. 2, p. 94-6, mar./abr. 2002.

MAGRO FILHO, O. *et al.* Biocompatibilidade das soluções de PVPI e de clorexidina. Estudo histológico em ratos. **BCI**, v. 5, p. 9-16, jul./set. 1998.

MALINOWSKI, L.R.L. *et al.* Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de folhas de *Artemisia vulgaris*. **R. Bras. Farm.**, v. 88, n. 22, p. 63-66, 2007.

MANZUR, A. *et al.* Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. **J. Endod.**, v. 33, n. 2, p. 114-8, 2007.

MARCHESAN, M.A. *et al.* Análise de algumas propriedades físico-químicas das águas sanitárias encontradas no mercado brasileiro. **R. Bras. Odontol.**, v. 55, n. 5, p. 301-303, 1998.

MAURYA, A.; SRIVASTAVA, S.K. Large-scale separation of clavine alkaloids from *Ipomoea muricata* by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v.877, n.18-19, p.1732-6. Jun., 2009.

MAYER M.P.A. **Diversidade e fatores de virulência de patógenos orais.** [Livre Docência], Universidade de São Paulo, São Paulo, p.149. 2004.

MCHUGH, C.P. *et al.* PH required to kill *Enterococcus faecalis in vitro*. **J. Endod.**, v. 30, n. 4, p.218-9, apr. 2004.

MENEZES, A.C.S.C.; ZANET, C.G.; VALERA, M.C. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. **Pesq. Odontol. Bras.** v. 17, n.4, p. 349-55, 2003.

MESQUITA, M.L. *et al.* Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnopharmacol.** v.123, n.3, p.439-45. Jun., 2009.

MILLER, W.D. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. **Dental Cosmos**, v. 36, p. 505-28, 1894.

MOLANDER, A. *et al.* Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int .Endod. J.**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 1998.

MÖLLER, A.J.R. Microbiological examinations of root canals and periapical tissues of human teeth. **Thesis Odont.**, v. 74, p. 1-380, 1966.

MOLYNEUX, R.J. *et al.* Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea sp.* Q6 [aff. *calobra*]) and correlation with toxicity. **J Nat Prod.** v.58, n.6, p.878-86. Jun.,1995.

MORITA *et al.* A new indole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*. *Planta Médica*, v.55, n.3, p.288-9, 1989.

MURRAY, B.E. The life and times of the enterococcus. *Clin. Microbiol. R.* v. 3, p. 46-65, 1990.

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*. v.342, p.710-721, 2000.

NARAYAN, A.V.; MADHUSUDHAN, M.C.; RAGHAVARAO, K.S. Extraction and purification of Ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning. *Appl Biochem Biotechnol.* v.151, n.2-3, p.263-72. Dec., 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; (Approved Standard - fifth edition M7-A5) supplemental tables M11-S10, v.20, n.2, january 2000, Wayne, Pennsylvania, 2000.

NGOUELA, S. *et al.* Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry*. v.67, n.3, p.302-6. Feb., 2006.

NGOUELA, S. *et al.* A prenylated xanthone with antimicrobial activity from the seeds of *Symphonia globulifera*. *Nat Prod Res.* v.19, n.1, p.23-7. Jan., 2005.

NKENGFAK, A.E. *et al.* Globulixanthenes A and B, two new cytotoxic xanthenes with isoprenoid groups from the root bark of *Symphonia globulifera*. *J Nat Prod.* v.65, n.5, p.734-6. May. 2002.

NKENGFAK, A.E. *et al.* Globulixanthenes C, D and E: three prenylated xanthenes with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry*. v.61, n.2, p.181-7. Sep., 2002.

OBOLSKIY, D. *et al.* *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytother Res.* [s/ vol. s/ n.] Jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172667?ordinalpos=9&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum>. Acesso em 05 mai. 2009.

OLIVEIRA, E.B.; FIGUEIREDO, J.P.O.; PIRES D.C.A. Avaliação da estabilidade do cloro ativo após aquecimento das soluções de hipoclorito de sódio. **R. Bras. Odontol.**, v. 60, n. 6, p. 404-405, 2003.

OLIVEIRA, G.F.T. **Avaliação da atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L) Skeels (Jambolão).** [Dissertação de Mestrado], Universidade de Franca, São Paulo. p.94, 2005.

ONO, M. *et al.* Resin glycosides from the leaves and stems of *Ipomoea digitata*. **Nat Med (Tokyo)**. v.63, n.2, p.176-80. Apr., 2009.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 6, n. 4, p. 142-9, Aug. 1990.

PAIVA, J.G.; GUTZ, I.; SAMPAIO, J.M,P. Determinação do teor de cloro livre nas soluções de hipoclorito de sódio. **R. Bras. Odontol.**, v. 56, n. 1, p. 10-16, jan./fev. 1989.

PARADELLA, T.C., KOGA-ITO, C., JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Rev Odontol UNESP**. v.36, n.2, p.163-168, 2007.

PARSONS, G.J. *et al.* Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.**, v. 49, n. 5, p. 455-9, may 1980.

PASTICCI, M.B. *et al.* *In Vitro* antimicrobial activity of ampicillin-ceftriaxone and ampicilli-ertapenem combinations against clinical isolates of *Enterococcus faecalis* with levels of aminoglycoside resistance. **The Open Microbiol J**. v.2, p.79-84, 2008.

PECCHIO, M. *et al.* Cytotoxic and antimicrobial benzophenones from the leaves of *Tovomita longifolia*. **J Nat Prod**. v.69, n.3, p.410-3. Mar., 2006.

PECIULIENE, V. *et al.* Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J. Endod.**, v. 26, p. 593-5, 2000.

PECIULIENE, V. *et al.* Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 34, n. 6, p. 429-34, 2001.

PERCORA, J.D. *et al.* Estudo sobre o Shelf life da solução de Dakin. **R. Odont. USP**, n. 1, v. 1, p. 3-7, 1987.

PEREDA-MIRANDA, R.; KAATZ, G.W.; GIBBONS, S. Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Nat Prod.** v.69, n.3, p.406-9. Mar., 2006.

PEREIRA, J.V. **Estudos com o extrato da *P. granatum Linn* (Romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental.** [Tese Doutorado em Estomatologia] – Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde, Paraíba. 2002.

PEREIRA, J.V. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de constituintes e de medicação intracanal à base de *Arctium lappa*.** 111p. [Dissertação Mestrado] Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2004.

PEREIRA, J.V. *et al.* Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. **Braz. Dent. J.**, v. 16, n. 3, p. 192-6, 2005.

PERIN, F.M. *et al.* Avaliação antimicrobiana in vitro de extratos aquosos fitoterápicos para uso endodôntico. **Pesq. Odontol. Bras.**, v, 15, n. 1, p.144, 2001.

PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; VANWINKELHOFF, A.J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 698-702, 2002.

PINHEIRO, E.T. **Estudo da microbiota de canais de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais e da susceptibilidade de *Enterococcus faecalis* a diferentes antimicrobianos.** 88p. [Tese de Doutorado], Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP, 2005.

PINHEIRO, E.T. *et al.* Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B. Identification on Entecocci isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions and their antimicrobial susceptibility to different antibiotics. **Int. Endod. J.**, v. 37, p. 346-347, 2004.

PINHEIRO, R.T. *et al.* Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic J.** Oxford, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jan., 2003.

PORTO, P.O.B. **Determinação das características físico-químicas e antimicrobianas de soluções experimentais à base de hipoclorito de sódio e óleo essencial.** [Tese de Doutorado], Camaragibe: Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco, 2004.

PROTIVA, J.; SCHWARZ, V.; MARTÍNKOVÁ, J. Failure to find intercellular protoplasmic continuity in *Griffithsia globulifera*. **J Gen Physiol.** v.34, n.5, p.525-8. May., 1951.

RABELLO, T.B.; COELHO, A.J.M. Efeito da clorexidina sobre a adesão dentinária e preservação pulpar. **Rev Bras Odontol.** v. 55, n. 3, p.136-139, 1998.

RADCLIFFE, C.E. *et al.* Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Astinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **Int. Endod. J.**, v. 37, n. 7, p. 438, 2004.

RAHUMAN, A.A. *et al.* Efficacy of larvicidal botanical extracts against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res.** v.104, n.6, p.1365-72. Jun., 2009.

RAMFJORD, S. **Periodontologia e periodontia.** São Paulo: Santos, 364 p. 1991.

RAMOS, I.N.C.; MARKOS, C.; MOTA, L.Q.A. Diabetes Mellitus e sua importância na odontologia. **JAO**, v. 3, n. 21, p. 33-6, 2001.

RAMS, T. *et al.* Enterococci in human periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** v.7, p.249-252, 1992.

RASSAMEEMASMAUNG, S. *et al.* Topical application of *Garcinia mangostana* L. pericarp gel as an adjunct to periodontal treatment. **Complement Ther Med.** v.6, n.5, p.262-7. Oct., 2008.

REIS, M.O.R. **Avaliação da atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Pessea gratissima* Gaertn – Abacateiro – Lauraceae.** 76p. [Dissertação de Mestrado], Universidade de Franca, São Paulo, 2006.

REYNAUD, A.F. *et al.* Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. **Oral Microbiol Immunol.** v.22, p.88-94, 2007.

REYNOLDS, W.F. *et al.* Isolation and characterization of cytotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from *Ipomoea stans*. **J Nat Prod.** v.58, n.11, p.1730-4. Nov., 1995.

RIBEIRO, D.A. *et al.* Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. **J. Periodont. Res.**, v. 39, p. 358-61, 2004.

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and application. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.117-137, 2002.

RINGEL, A.M. *et al.* In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. **J. Endod.**, v. 8, n. 5, p. 200-5, 1982.

RÔÇAS, I.N.; VALOIS, C.R.A.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Detecção de bacterioides forsythus em dez casos de infecção endodôntica pelo método da polymerase chain reaction. **Rev Bras Odontol.** v. 58, n.4, p. 244-7, 2001.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different form of periradicular diseases. **J. of Endod.**, v. 30, p. 315-20, 2004.

ROLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition of chlorhexidine. **J. Dent. Res.**, v. 54, p. 57-62, 1975.

ROLPH, H.J. *et al.* Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **J Clin Microbiol.** v.39, p.3282-9, 2001.

RUANO, P.; CIAMPONI, A.L. Efeito da clorexidina na desinfecção prévia de cavidades restauradas com compômeros. **Rev da Assoc Bras Odontol Nacional.** v. 10, n. 2, p.145-148, jun/jul., 2002.

RUIZ-JUNIOR, E.; SCHIRMBECK, T.; FIGUEIREDO, L.T.D. Estudo sobre endocardite infecciosa em Ribeirão Preto, SP-Brasil. Análise de casos ocorridos entre 1992 e 1997. **Arq Bras Cardiol.**, v.74, n.3, p.217-224, 2000.

SAEED, M.A.; SABIR, A.W. Antibacterial activities of some constituents from óleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 204-8, 2004.

SALAH, R. *et al.* Prevalence of purative virulence factores and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. **BMC Oral Health**. v. 8, n.17, p.2-7, 2008.

SALEM, A.M. *et al.* Antimicrobial properties of two aliphatic amines and chlorhexidine in vitro and i saliva. **J. Clin. Periodotol.**, v. 14, n. 1, p. 44-7, 1987.

SANDRI, A.M. ***Enterococcus spp.* resistente à vancomicina: tipagem molecular, caracterização clínica e associação com mortalidade.** [Dissertação de Mestrado], UFRGS, Programa de Pós-graduação em Medicina, Porto Alegre:. 2004.

SANTIAGO, M.R.J. *et al.* Avaliação sob MEV da limpeza de canais radiculares através da clorofila, clorox e clorexidina. **Pesq. Odontol. Bras.** v. 16, p. 38, 2002.

SANTOS, E.M. *et al.* **Toxicidade de diferentes concentrações de clorexidina líquida e gel em cultura celular.** *In:* Reunião da SBPqO 2000; 17, resumo B154.

SANTOS, T.C. **Estudo *in vitro* do aumento da temperatura das soluções de hipoclorito de sódio sobre duas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino.** 108p. [Dissertação de Mestrado], Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

SASSONE, L.M. *et al.* The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine in vitro. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 12, p .848-52, 2003.

SASSONE, L.M. *et al.* Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. **Braz Dent J.** v.14, n.2, p.99-102, 2008.

SCHÄFER, E.; BOSSMAN, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v. 31, n. 1, p. 53-6, 2005.

SCHEIE, A.A.; HJEILEN, J.C. Effects of chlorhexidine, naf and srf2 on glucan formation by salivary and culture supernatant GTF adsorbed to hydroxiapalite. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, n. 6, p. 532-5, 1987.

SCHIMMING, T. *et al.* N1,N10-ditigloylspermidine, a novel alkaloid from the seeds of *Pomoea nil*. **Pharmazie**. v.60, n.12, p.958-9. Dec., 2005.

SCHIMMING, T. *et al.* Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**.v.66, n.4, p.469-80, Feb., 2005.

SEDGLEY, C.M. *et al.* Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, p. 10-19, 2005.

SEDLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **J Endod.** v.32, p.104-109, 2006.

SHABAHANG, S.; POURESMALL, M.; TORABINEJAD, M. In vitro antimicrobial efficacy of MTAD and sodium hypochlorite. **Endodo.**, v. 29, n. 7, p. 450-2, 2003.

SILVA, J.A. **Avaliação em estudos longitudinais da eficácia do hipoclorito de sódio e da clorexidina sobre o *Enterococcus faecalis* presente em infecções endodônticas – Revisão sistemática.** 108p., [Dissertação de Mestrado], Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, , 2007.

SILVEIRA. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, n.2, abr./jun., p.143-8, 2005.

SIMI, J.; PESCE, H.F.; MEDEIROS, J.M.F. Eficácia de substâncias químicas auxiliares na instrumentação de canais radiculares. **R. Odontol. Univ. São Paulo.** v.2, p. 153-157, 1999.

SIQUEIRA, E. L. Estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. **ECLER Endod.**, v. 2, n. 3, 2000.

SIQUEIRA JUNIOR, J.A. **Tratamento da infecção endodôntica**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 130, 1997.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. *et al.* Antibacterial effects of endodontic irrigants on Black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J. Endod.**, v. 24, n. 6, p. 414-6, 1998.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. *et al.* Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. and Endod.**, v. 89, p. 744-748, 2000.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. *et al.* Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. **J. Endod.**, v. 28, p. 181-4, 2002.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. *et al.* Fungal infection of the radicular dentin. **Journal of Endodontics.**, v.28, n.11, 2002.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. *et al.* Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: A molecular investigation. **Journal of Endodontics.**, v.30, n.9,p.638-643, 2004.

SIQUEIRA JUNIOR, F.J.; RÔÇAS, I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. and Endod.**, v. 97, p. 85-94, 2004.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; ROÇAS, I.N. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontics infections. **Int Endod J.**, v.36, n.3, p.174-180, 2003a.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; ROÇAS, I.N. Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infection. **Journal of Endodontic.**, v.29,n.7,p.438-441,2003b.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; ROÇAS, I.N. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 650, 1999.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; ROÇAS, I.N. Recontaminations of coronally unsealed root canals medicated with comphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. **J. Endod.**, v. 24, n. 1, p. 11-14, 1998.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; ROÇAS, I.N. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J. Endod.**, v. 23, n. 3, p. 167-9, mar. 1997.

SOBRAL, A.P.V. *et al.* Estudo histoquímico da presença de bactérias em lesões cariosas e periapicais. **Rev Cir Traum Buco-Maxi-fac.**, v.7, n.2, p.61-68, 2007.

SOKENG, S.D. *et al.* Inhibitory effect of Ipomoea aquatica extracts on glucose absorption using a perfused rat intestinal preparation. **Fitoterapia.**, v.78,n.7-8, p.526-9. 4. Dec.,2007.

SOUTO, R. *et al.* Prevalence of non-pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. **Braz J Microbiology.** v.37, p.208-215, 2006.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de Aloysia gratissima (Gil et Hook) tronc. (garupa, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **R. Bras. PL Med.**, v. 9, n. 3, p. 23-29, 2007.

SOUZA, M.M. *et al.* Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from Ipomoea pes-caprae (L.). **J Ethnopharmacol.**, v.69, n.1, p.85-90. Jan., 2000.

SOUZA, V. *et al.* Reação dos tecidos periapicais de dentes de cães a clorexidina ou antibiótico associado a corticosteróide. **Revista Regional de Araçatuba APCD.**, v. 2, n. 2, p. 5-9, 1981.

SPANÓ, J.C.E. *et al.* Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. **Braz. Dent. J.**, v. 12, n. 3, p. 154-179, 2001.

SPONCHIADO-JUNIOR, E.C. **Atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe ummbrellata*.** [Tese de Doutorado], Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

STEED, L.E.; TRUONG, V.D. Anthocyanin content, antioxidant activity, and selected physical properties of flowable purple-fleshed sweetpotato purees. **J Food Sci.**, v.73, n.5, p.S215-21. Jun.,2008.

STEFANELLO, M.E.A. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa*. **R. Bras. Farmacog.** São Paulo, v. 16, n. 4, p. 525-30, 2006.

STEROID DERIVATIVES. II. Formation of 5-beta-saturated steroid derivatives by the 11-hydroxylating fungus *Beauveria globulifera*. **Folia Microbiol (Praha)**., v.13, n.2, p.139-45, 1968.

STUART, C.H. *et al.* *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J. Endod.**, v. 32, n. 2, p. 93-8, 2006.

SUFFREDINI, I.B. *et al.* *In vitro* Anti-HIV and Antitumor Evaluation of Amazonian Plants Belonging to the Apocynaceae family. **Phytomedicine.** v. 9, p. 175, 2002a.

SUFFREDINI, I.B. *et. al.* As bases fisiológicas do câncer e a pesquisa de novos antineoplásicos. A importância da biodiversidade brasileira. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 20, n. 2, p. 103-28, 2002b.

SUFFREDINI, I.B. *et al.* Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.

SUFFREDINI, I.B. *et al.* Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 287-290, 2006a.

SUFFREDINI, I.B. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 6, p. 400-402, 2006b.

SUFFREDINI, I.B. *et al.* *In vitro* breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie.**, v.62, n.10, p.798-800, Oct.,2007.

SUNDE, P.T. *et al.* Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J. Endod.**, v. 28, n. 4, p. 304-310, 2002.

SUNDQVIST, G. *et al.* Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

SUNDQVIST, G. *et al.* Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root flora. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 78, n. 4, p. 522-30, Oct., 1994.

SUNDQVIST, G. *et al.* Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. **Endod. Top.**, v.6, p. 3-28, 2003.

SWENSON, J.M.; HINDLER, J.A; PETERSON, L.R. **Manual of Clinical Microbiology**. 7^aed. Washington, American Society for Microbiology, p.1356-1367, 1999.

TANOMARU, J.M.G. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em endodontia. **R. Paul. Odontol.**, v .27, n. 1, p. 38-40, 2005.

TAO, H. *et al.* Resin glycoside constituents of *Ipomoea pes-caprae* (beach morning glory). **J Nat Prod.** v.71, n.12, p.1998-2003. Dec.,2008.

TEIXEIRA, F.B.; SOUZA FILHO, F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentration of sodium hypochlorite and clorexidine gluconate in the elimination of *E. faecalis*. **J. Endod.**, v. 34, p. 424-8, 2001.

TEIXEIRA, V.B. Curativos de demora convencionais e alternativos em necropulpectomia. **J. Bras. End.**, v. 6, n. 23, p. 40-46, 2006.

TOMAZINHO, L.F. *et al.* Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras na eliminação de *Enterococcus faecalis*. **RSBO**, v. 4, n. 1, p. 12-16, 2007.

THE MERCH INDEX. An Encyclopedia of chemicals, drugs and Biologicals. 12^a Ed., Whitehouse Station, NJ, USA, NI-360, p.348, 1996.

UIP, D.E. *et al.* Infecções bacterianas em 100 pacientes submetidos a transplante cardíaco. **Arq Bras Cardiol.**, v.66, n.3, p.135-137, 1996.

VAN DER WEIJDEN, G.A. *et al.* Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. **J Clin Periodontol.**, v.32, n.1, p.89-92, 2005.

VARGAS, P.; MORTON, C.M.; JURY, S.L. Biogeographic patterns in Mediterranean and Macaronesian species of *Saxifraga* (Saxifragaceae) inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. **Am J Bot.** v.86, n.5, p.724. May., 1999.

VIANNA, M.E. *et al.* *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemomechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int. Endod. J.**, v. 39, p. 484-92, 2006.

VIANNA, M.E. *et al.* Atividade **antimicrobiana *in vitro* de gluconato de clorexidina**. *In*: Reunião da SBPqO 2000; 17, resumo I256.

WANG, C.S. *et al.* Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. **J. Endod.**, v. 33, n. 11, p. 1283-9, nov. 2007.

WANG, L.L. *et al.* Chemical constituents from barks of *Garcinia tetralata*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.**, v.33, n.20, p.2350-2. Oct., 2008.

WHITE, R.R.; HAYS, G.L.; JANER, L.R. ***Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine***. *J. Endod.*, v. 23, n. 4, p. 229-31, apr. 1997.

WILLIAMS, J.M. *et al.* Detection and quantitation of *Enterococcus faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. **J. Endodont.**, v. 32, n. 8, p. 715-21, 2006.

WILLIAMS, R.B. *et al.* A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest. **Planta Med.** v.69, n.9, p.864-6, Sep., 2003. Erratum in: **Planta Med.**, v.71, n.4, Apr., 2005.

WILSON, E.O.; PETER, F.M. **Biodiversity**. National Academic Press: Washington, DC, 1988.

YATES, R. *et al.* A mouth home visage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste. Effects on plaque, gingivitis, calculus ad teeth training. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, n. 2, p. 30-8, 1993.

YESILSOY, C. *et al.* Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. **J. Endodon.**, v. 21, n. 10, p. 513-5, 1995.

YEUNG, S.Y. *et al.* Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. **Int. Endod. J.**, v. 40, p. 837-44, 2007.

YIN, Y.Q. *et al.* Three new pentasaccharide resin glycosides from the roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Chem Pharm Bull (Tokyo)**., v.56, n.12, p.1670-4, Dec., 2008.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Extração e Rastreamento de Novas Drogas em Plantas Brasileiras. **Acta Oncol. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 15-19, 2000.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics.** , v. 62, n. 6, p. 763-8, 2007.

ZANATTA, F.B., ANTONIAZZI, R.P., RÖSING, C.K. The effect of 0.12% chlorhexidine rinsing in previously plaque-free and plaquecovered surfaces. A randomized controlled clinical trial. **J Periodontol.**, v.78, n.11, p.2127-2134, 2007.

ZARRILI, R. *et al.* Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v.56, p.827-835, 2005.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J. Endod.**, v.32, n.5, p. 389-98, 2006.

ZERELLA, J.A.; FOUAD, A.F.; SPANBERG, L.S. 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.**, v.100, n.6, p. 756-61, 2005.

ZOLETTI, G.O; SIQUEIRA, J.R.J.F; SANTOS, K.R. Identification of enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. **J. Endod.**, v. 32, n.8, p.722-6, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)