UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

MAURÍCIO ANTÔNIO MIRANDA

Atividade antimicrobiana das soluções de Barbatimão, Mamona e Clorexidina utilizadas na Endodontia. Avaliação comparativa *in vitro*.

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MAURÍCIO ANTÔNIO MIRANDA

Atividade antimicrobiana das soluções de Barbatimão, Mamona e Clorexidina utilizadas na Endodontia. Avaliação comparativa *in vitro*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Prof. Dra. Izabel Cristina Fröner

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Preparada pela Biblioteca Central do Campus da USP de Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Miranda, MA

Avaliação comparativa da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão), do detergente de mamona (Endoquil) e da solução de clorexidina a 2%, frente a alguns microrganismos presentes em infecções endodônticas / Maurício Antônio Miranda; orientadora Izabel Cristina Fröner. Ribeirão Preto, São Paulo, 2010.81f

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Odontologia Restauradora. Área de concentração: Endodontia.

1. Endodontia. 2. Barbatimão. 3. Clorexidina. 4. Endoquil.

5. Avaliação antimicrobiana. 6. Bactérias anaeróbias.

Nome: Maurício Antônio Miranda

Título: Avaliação comparativa da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão), do detergente de mamona (Endoquil) e da solução de clorexidina a 2%, frente a alguns microrganismos presentes em infecções endodônticas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

À minha orientadora, com carinho, admiração e respeito por sua dedicação e apoio incondicional ao longo do período de elaboração deste humilde trabalho.

AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas poderiam entrar na minha lista de agradecimentos, mas especialmente dedico este trabalho:

- à minha mãe, por seu carinho e grandeza;

- ao Prof. Dr. Carlos Henrique Lopes Martins, pelo apoio e incrível gentileza do início ao fim;

- a toda equipe do laboratório de microbiologia da UNIFRAM em especial à Gorete, a quem devo enorme respeito e admiração;

- ao Prof. Dr. José Paulo Ribas, exemplo de professor e profissional da odontologia;

- aos professores doutores Marisa Semprini, Paulo Nelson Filho e Mônica Serra, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis;

- aos amigos, os de sempre, e à toda a minha família.

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

Albert Einstein

RESUMO

MIRANDA, MA. Avaliação comparativa da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão), do detergente de mamona (Endoquil) e da solução de clorexidina a 2%, frente a alguns microrganismos presentes em infecções endodônticas.[dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2010, 81f.

No presente trabalho foram avaliadas as atividades antimicrobianas do extrato hidroalcoólico do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens)*, do detergente de mamona (Endoquil Poliquil®) e da solução de digluconato de clorexidina a 2% sobre microrganismos bucais potencialmente envolvidos em infecções endodônticas O barbatimão, como é popularmente conhecido, é muito utilizado na medicina popular para o tratamento de algumas enfermidades como a gonorréia, diarréia, úlceras, como antiinflamatório e cicatrizante. O detergente de mamona (*Ricinus communis*) possui atividade antimicrobiana similar ao do hipoclorito de sódio a 0,5% quando usado no tratamento de canais com polpa necrosada. A clorexidina é muito conhecida por sua atividade antimicrobiana e tem sido utilizada como medicação intracanal, apresentando efeito antimicrobiano residual, ou substantividade, além de baixa toxicidade. Este trabalho tem por objetivo comparar as atividades antimicrobianas destas substâncias pela técnica da difusão (técnica do cilindro) e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente aos seguintes microrganismos: *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, *Actinomyces naeslundii* (cepa de campo), *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Enterococcus faecalis* (cepa de campo), *Haemophilus actinomycetemcomitans* ATCC 43717. Os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA) e mostraram a atividade antimicrobiana do extrato bruto do barbatimão mais efetivo que o Endoquil® no teste de difusão,mas menor efetividade que a solução de clorexidina 2% em relação a todos os microrganismos utilizados. Conclui-se que o extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens (*barbatimão) apresenta atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes nas infecções endodônticas, segundo os parâmetros empregados nesta pesquisa.

Palavras-chave: Barbatimão, Atividade antimicrobiana, Endoquil, Clorexidina.

ABSTRACT

MIRANDA, MA. Antimicrobial activities of *Stryphnodendron adstringens*, *Ricinus communis* detergent and chlorhexidine solutions in Endodontics. *In vitro* comparative study. [dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2010, 81f.

Antimicrobial activities of the hydroalcoholic extract of Barbatimão(*Stryphnodendron adstringens)*, the detergent of castor bean (Endoquil, Poliquil®), and the Chlorhexidine 2% on oral microorganisms potentially involved in endodontic infections were evaluated. The Barbatimão, as it is popularly know, is often used in popular Medicine to treat some diseases like gonorrhea, diarrhea, ulcer, as an anti-inflammatory and cicatrizant. As observed in the literature, the detergent derived from the castor bean oil (*Ricinus comunis*) has similar antimicrobial activity to the sodium hypochlorite 0.5% when used on the treatment of canals with pulp showing necrosis. The Chlorhexidine is well known for its antimicrobial activity and it has been used as auxiliary solution in Endodontics, showing residual antimicrobial effect, or substantivity, as well as low toxicity. The aim of this study is to compare the antimicrobial activities of those substances by the diffusion technique (cylinder technique) and by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) in the following microorganisms: *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, *Actinomyces naeslundii* (cepa de campo), *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Enterococcus faecalis* (cepa de campo), *Haemophilus actinomycetemcomitans* ATCC 43717. The results were subjected to statistical analysis (ANOVA) and showed that the antimicrobial activity of the raw extract of barbatimão was more effective than the Endoquil®, but still less effective than the Chlorhexidine 2% when compared to all studied microorganisms in agar diffusion method. It can be concluded that the raw extract of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) has antimicrobial activities on microorganisms, according to the parameters used in this study.

Keywords: Barbatimão, antimicrobial activity,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *Ricinus communis* (mamona), com frutos no centro

Fonte: acervo pessoal do autor

Figura 2 – Árvore do barbatimão *(Stryphnodendron adstringens)*

Fonte: Acervo pessoal do próprio autor

Figura 3- Folhas do barbatimão em destaque

Fonte: Acervo pessoal do próprio autor

Figura 4- Aspecto da casca e do caule avermelhado do barbatimão

Fonte: Acervo pessoal do próprio autor

Figura 5 – Figura 5 – Esquema mostrando a técnica de Difusão em placa (A- preparo das placas de petri,http://portal.ipvc.pt; B- início da inoculação das placas; C-colocação dos cilindros de aço; D- inserção das substâncias nos cilindros; E- placa mostrando os halos de inibição para o *Enterococcus faecalis;* F-placa mostrando os halos de inibição para o *Prevotella nigrescens;* G-placa mostrando os halos de inibição para o *Porphyromonas gingivalis;* H-mensuração dos halos de inibição com régua milimetrada).

Figura 6 – Figura 6 – Seqüência laboratorial do teste de concentração inibitória mínima (CIM). (A - Padronização do inóculo com a escala MF; B – Preparo para colocação do inóculo nas microplacas; C - Colocação dos inóculos; D – Colocação das substâncias testadas; E – Câmara de anaerobiose; F – Detalhe das microplacas na câmara; G – Preparo da resazurina (solução reveladora); H - Microplaca do *P. gingivalis* após adição da resazurina).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas utilizadas, mostrando origem, grupos e gêneros bacterianos.
*Estas espécies sofreram mudanças em relação à taxonomia e são tidas como Bacteroides Melaninogenicus, segundo consta em MACHADO, 2007[85].

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana das soluções de barbatimão, Endoquil® e clorexidina frente aos microrganismos *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Actinomyces naeslundii* (cepa de campo), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), pelo método de difusão em ágar (técnica dos cilindros de aço).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana das soluções de barbatimão, endoquil e clorexidina frente aos microrganismos *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana das soluções de barbatimão, Endoquil® e clorexidina frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Enterococcus faecalis*
(Cepa de campo) e *Haemophilus actinomycetemcomitans* (ATCC 43717).

Tabela 5 – Resultados obtidos pela técnica microdiluição em caldo (CIM) frente aos microrganismos testados.

Tabela 6 – Resultados da análise estatística para o teste de difusão, com base nas médias dos halos de inibição.

Tabela 7- Resultados da análise estatística dos dados obtidos pelo teste de microdiluição para determinação da CIM

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1- Obtenção do extrato de barbatimão

Fluxograma 2- processo de elaboração da concentração para o teste de difusão

Fluxograma 3- Disposição das substâncias em cada cilindro da placa (cilindro verde= EHBB, laranja= Endoquil®, azul-celeste=clorexidina, cinza=DMSO, rosa=água)

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ATCC – American Type Culture Collection

CIM – Concentração Inibitória Mínima

C(-) – Controle Negativo

C(+) – Controle Positivo

Chx. - Clorexidina

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EHBB – Extrato Hidroalcoólico Bruto do Barbatimão

g – gramas

HOCl- ácido hipocloroso

m – metro

mg – miligramas

mg/mL – miligramas por mililitro

mL – mililitro

mm - milímetro

MF – Mac Farland

NaOcl- hipoclorito de sódio

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – potencial hidrogeniônico

TSB – Caldo Triptona de Soja

UFC – Unidade Formadora de Colônia

µL – microlitro

µg/ml – micrograma por mililitro

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Desvio padrão referente às médias dos halos de inibição do teste de difusão.

Gráfico 2 – Desvio padrão dos valores obtidos no teste de microdiluição (CIM) para as substâncias testadas.

Gráfico 3- Representação dos dados estatísticos para o teste de difusão.

Gráfico 4 – Representação dos dados estatísticos da microdiluição (CIM).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Microbiologia e Endodontia 2

1.2 Soluções químicas auxiliares 3

1.3 Substâncias naturais alternativas 5

2. PROPOSIÇÃO 19

3. MATERIAIS E MÉTODOS 21

3.1 Obtenção das substâncias utilizadas 22

3.2 Preparo das soluções 23

3.2.1 Preparo das soluções para o método de difusão em ágar (técnica dos cilindros) 23

3.2.2 Preparo das soluções para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 24

3.3 Avaliação antimicrobiana 24

3.3.1 Microrganismos estudados 24

3.3.2 Método de difusão em Agar 25

3.3.2.1 Preparo do meio de cultura 26

3.3.2.2 Preparo do inoculo bacteriano 26

3.3.2.3 Controles utilizados 27

3.3.2.4 Seqüência da técnica 27

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 30

3.4.1 Preparo das soluções 30

3.4.2 Preparo dos controles utilizados 30

3.4.3 Preparo do inoculo bacteriano 31

3.4.4 Procedimento 31

3.5 Análise estatística 34

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

4.1 Resultados das substâncias testadas 36

5. CONCLUSÕES 53

6. REFERÊNCIAS 55

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiologia e Endodontia

Dentre as ciências básicas, aquela que mais se aproxima da endodontia é a microbiologia, pois a maioria das doenças pulpares está associada a microrganismos. Os estudos pioneiros de MILLER(1894)[1], considerado o pai da microbiologia oral, foram os primeiros a associar a presença de bactérias à doença pulpar e, a partir de então, tem aumentado o interesse na microbiologia das diversas patologias endodônticas.

Um estudo de KAKEHASHI et al. publicado em 1965, constatou que as bactérias causavam doenças pulpares e perirradiculares[2]. Neste clássico estudo, os pesquisadores verificaram que a exposição da polpa em ratos com flora bacteriana normal produziu necrose pulpar e a formação de lesões apicais. No entanto, nenhuma patologia desenvolveu-se em ratos gnotobioóticos (*germ-free*) quando tiveram a polpa dental exposta.

O que podemos afirmar hoje, é que as infecções endodônticas são polimicrobianas e, além disso, o conhecimento do número de microrganismos detectados nas infecções endodônticas tem aumentado à medida que os meios de cultura melhoraram e métodos moleculares mais sensíveis foram desenvolvidos.

A via mais comum para a entrada de microrganismos na polpa é a cárie dental. Sabemos, porém, que as bactérias podem invadir os tecidos pulpares e os canais radiculares por outras vias, como por infiltrações marginais de restaurações, canais laterais, bolsas periodontais, fraturas de coroas e/ou raízes, entre outros.

Existem mais de 500 espécies bacterianas que habitam a cavidade oral (JUNG, et al. 2000), mas cabe ressaltar que a microbiota relacionada aos canais radiculares e estruturas adjacentes compõe um grupo de aproximadamente 150 bactérias identificadas[3].

Há uma prevalência de anaeróbios estritos nos canais radiculares infectados[4,5]. Tais microrganismos apresentam um potencial de oxirredução baixo e crescem na ausência de oxigênio, embora tenham variações na sua sensibilidade ao oxigênio. As

bactérias tidas como anaeróbicas estritas não possuem enzimas dismutase e catalase, superóxidas. Outras bactérias são microaerófilas, podendo crescer na presença de oxigênio, retirando grande parte de sua energia através de vias anaeróbicas. Já as bactérias anaeróbicas facultativas podem crescer tanto na presença ou ausência de oxigênio, ao passo que as bactérias aeróbicas estritas possuem enzimas dismutase e catalase, requerendo oxigênio para se desenvolverem[6].

1.2 Soluções químicas auxiliares

Há um interesse cada vez maior no desenvolvimento de técnicas de instrumentação e de substâncias químicas auxiliares à terapia endodôntica, visando remover as bactérias, substratos e os subprodutos bacterianos, pois infelizmente os microrganismos no interior do sistema de canais radiculares não podem ser alcançados e debelados pelas células de defesa do hospedeiro.

Vários estudos vêm demonstrando que a instrumentação mecânica não consegue desinfetar totalmente os canais radiculares, independentemente se forem utilizados instrumentos de aço[7] ou de níquel-titânio[8]. Fica nítido que soluções auxiliares de irrigação são necessárias para eliminar os microrganismos e, ao longo do tempo, muitas substâncias químicas têm sido usadas e sugeridas para esse fim.

Um irrigante ideal deve eliminar microrganismos, dissolver tecido necrótico, lubrificar o canal, remover *smear layer* e não irritar os tecidos saudáveis[9,10]. Sabemos que a chamada biomecânica dos canais radiculares possui uma fase mecânica e uma fase química, aplicadas concomitantemente. A ação mecânica, ou física, compreende a irrigação e aspiração que remove os tecidos dissolvidos ou que estão suspensos. A ação química compreende a atividade antimicrobiana e a propriedade de dissolução tecidual[11].

De forma bastante simplificada, podemos citar como coadjuvantes à terapia endodôntica as seguintes substâncias: os álcalis, associação de fármacos, detergentes, agentes quelantes e a clorexidina[12].

O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem seu uso consagrado há décadas, reunindo propriedades desejadas para um irrigante, tais como: ação bactericida, de saponificação de gorduras, ação sobre proteínas, desodorizante e clareadora. O NaOCl (o sal de hipoclorito de sódio) reage com a molécula de água formando o hidróxido de sódio (NaOH) que é uma base forte, e o ácido hipocloroso (HOCl) que é um ácido fraco. Assim, o hidróxido de sódio funciona como solvente orgânico e de gorduras, numa reação de saponificação. O ácido hipocloroso possui efeito antimicrobiano liberando cloro nascente, o qual se liga ao grupamento NH dos aminoácidos, formando as cloraminas, interferindo assim no metabolismo celular e também inibe a função enzimática bacteriana, através de uma oxidação irreversível dos grupos sulfidrila (SH) de enzimas bacterianas essenciais[13,14].

O hipoclorito pode ser usado em várias concentrações, sendo que as mais utilizadas são aquelas que variam de 0,5% a 5,25% de cloro livre. De acordo com os trabalhos de AUN & PAIVA (1982) e SCHMIDT (2005), a concentração tida como ideal fica em torno de 0,5% a 1,0%, pois concentrações superiores não apresentam uma melhor capacidade bactericida, e podem causar agressão aos tecidos periapicais [14,15]. Um dado importante é que o hipoclorito até 1% leva 15 minutos para exercer suas propriedades.

Talvez uma das mais importantes considerações acerca do hipoclorito de sódio é sobre o cuidado que se deve ter para não injetar o hipoclorito com muita pressão ou muito próximo ao forame apical, para que não ocorra um extravasamento da substância para a região periapical. Cuidados devem ser tomados na região de molares e pré-molares superiores, para que o hipoclorito não adentre no seio maxilar, causando irritações e maiores complicações. Esse cuidado deve ser ainda maior quanto maior for a concentração de hipoclorito que se estiver usando. São relatados casos em que foram injetados a solução de hipoclorito na região de dentes anteriores superiores que atingiram a região infra-orbital e assoalho nasal do paciente(REEH e MESSER, 1989) [16] ou ainda região de olho (IMGRAM, 1990) [17] .

Importante ressaltar que, dentre as maiores desvantagens do NaOCl são os efeitos citotóxicos, quando injetado nos tecidos periapicais, como mencionado anteriormente, além do gosto e cheiro desagradáveis, do fato de manchar roupas, e do seu potencial corrosivo[18,19]. Também já foram relatados casos de **alergia** quando foi

utilizado[20] o hipoclorito de sódio, o que mostra que este irrigante carece de cuidados na sua utilização.

A clorexidina (chx) é um agente microbiano considerado de amplo espectro eficaz contra bactérias gram-negativas e gram positivas. A clorexidina possui um componente molecular catiônico, apresentando elevada afinidade pela parede celular bacteriana alterando as estruturas da superfície dessa parede, fazendo com que a membrana citoplasmática fique destruída havendo, dessa forma, formação de vesículas e precipitação do citoplasma, alterando o equilíbrio osmótico celular[21,22].

A clorexidina tem sido amplamente usada na terapia periodontal, ao passo que seu uso como uma substância auxiliar na instrumentação endodôntica é baseado na chamada substantividade e no seu potencial antimicrobiano de longa duração[23,24,25].

O tempo de ação antimicrobiana da clorexidina a 2% em gel mostrou-se similar às soluções a 1% e 2% (15 segundos), sendo estatisticamente diferente apenas contra o *Enterococcus faecalis*, que consumiu mais tempo (1 minuto). Assim sendo, a clorexidina, tanto em gel quanto em solução, demonstrou ser um potente agente antimicrobiano[26]. A clorexidina, ou digluconato de clorexidina, assim como o hipoclorito de sódio a 5,25%, mostraram uma performance antimicrobiana similar[27,28].

A clorexidina, ao contrário do hipoclorito de sódio, não dissolve tecido orgânico[29], mas sua viscosidade auxilia na remoção de tecidos orgânicos dos canais, o que de uma certa forma compensa o fato de não poder dissolvê-los. Podemos dizer que a clorexidina tem grande potencial para ser um irrigante de rotina na endodontia, baseando-se nos seus efeitos antimicrobianos[30], porém fica evidente que é bem mais apropriada para casos onde existe ápice aberto ou reconhecida alergia ao hipoclorito.

1.3 Substâncias naturais alternativas

Nos dias atuais, é crescente o aumento por novas substâncias, que possam ser utilizadas na odontologia, principalmente na endodontia. Essas novas sustâncias devem associar a eficiência antimicrobiana e boa tolerância por parte dos tecidos periapicais. Além disso, de uma forma geral, o interesse dos pesquisadores e da população pelas

plantas medicinais, o que em parte acontece em virtude da ineficiência de alguns medicamentos convencionais, devido ao alto custo dos alopáticos e também pela busca por tratamentos menos agressivos ao corpo humano principalmente em se tratando de atendimento básico de saúde[31].

Os chamados medicamentos fitoterápicos são geralmente extratos, tinturas, chás, pomadas e cápsulas de ervas, obtidos a partir de uma ou mais plantas, e são usados na chamada medicina popular. Muitas vezes as substâncias ativas que são responsáveis pelos efeitos benéficos dessas formulações caseiras são desconhecidas. O que sabemos é que os fitoterápicos têm um amplo uso terapêutico, baixo custo e grande distribuição entre a população de baixo poder aquisitivo[32]. Assim sendo, é importante que o fitoterápico, para que seja comercializado, tenha registro no Ministério da Saúde[33].

A procura por novos produtos tem sido amplamente recomendada pela Organização Mundial de saúde, tal fato é de extrema importância para o Brasil, onde cerca de 80% da população não tem acesso aos medicamentos básicos[34] e, além disso, muitos dos novos medicamentos são baseados em pesquisas com ervas e plantas da nossa flora, que comporta uma incrível biodiversidade. Estima-se que no Brasil existam 55.000 espécies vegetais catalogadas, sendo que apenas 8% das espécies foram estudadas em termos de compostos bioativos[35].

Uma dessas substâncias é o óleo de mamona (*Ricinus communis*), amplamente estudada pelo professor Gilberto Orivaldo Chierice, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP). Suas pesquisas lhe renderam uma aprovação da FDA (Food and Drug Admnistration), abrindo portas para inúmeras pesquisas utilizando essa matéria-prima e seus subprodutos (Figura 1).

Figura 1 – *Ricinus communis* (mamona), com frutos no centro

Fonte: acervo pessoal do autor

Através dos polímeros derivados do óleo de mamona, a área médica se beneficiou em vários aspectos, já a Odontologia ganhou a possibilidade de trabalhar com o detergente de mamona tanto na Periodontia, com o Perioquil®, tanto na Endodontia com o Endoquil®, como substância auxiliar irrigadora dos canais radiculares (Endoquil e Perioquil, Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda.)[36]

Os primeiros trabalhos com os subprodutos da mamona tiveram uma ênfase na sua biocompatibilidade e capacidade osteocondutora, dessa forma, IGNÁCIO, em 1995, verificou que um cimento derivado do polímero da mamona mostrou ser uma substância osteocondutora no preenchimento ósseo em antebraços de coelhos[37]. Seguido uma linha de pesquisa semelhante, ARAÚJO et al. 1996, avaliaram a cicatrização alveolar de dentes de ratos extraídos após implante de uma resina natural também derivada do óleo de mamona e constataram progressiva neoformação óssea paralelamente a uma diminuição do volume de tecido conjuntivo e da cápsula fibrosa ao redor do implante[38].

Num outro trabalho, SUGUIMOTO, em 1997, avaliou a reação do tecido ósseo na presença de implantes de polímero de mamona, observando que no grupo de animais que receberam estes implantes sobre o mento (fixados com parafusos de titânio), o polímero mostrou-se biocompatível do ponto de vista microscópico, mas não se constatou indução de formação óssea ao redor dos implantes[39]. LAMANO CARVALHO et al. também testaram a biocompatibilidade do polímero de mamona em 1997, utilizando-se de ratos. O polímero foi introduzido no alvéolo dos animais, sendo que o exame microscópico revelou os grânulos do polímero no local, mas sem a típica reação de corpo estranho. Na análise histométrica constatou neoformação óssea, com presença de trabeculado ósseo em contanto íntimo com o produto implantado. Concluíram que o material foi biocompatível, mostrando osteointegração progressiva ao longo do processo de reparo tecidual[40].

Na Endodontia, o primeiro trabalho com o detergente de mamona foi realizado por FERREIRA et al. (1999), com avaliação *in vivo*, comparando a atividade antimicrobiana do gel de Papaína a 0,4%, do detergente derivado do óleo de mamona a 10% e do hipoclorito de sódio a 0,5%, em dentes com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente. Verificou-se a atividade antimicrobiana das três soluções testadas, sendo que o gel de papaína apresentou menor efetividade em relação ao detergente de mamona e o hipoclorito, que mostraram resultados semelhantes[41].

FERREIRA ainda realizou, em 1999, outro trabalho, com intuito de padronizar o teste de diluição em caldo para determinação da suscetibilidade de anaeróbios estritos sob a ação de irrigantes tradicionais e substâncias em teste, empregadas no preparo biomecânico de canais radiculares. Nesta pesquisa, foi utilizado o detergente de mamona a 10% o digluconato de clorexidina a 2%, paramonoclorofenol canforado a 35% e uma solução de hidróxido de cálcio a 10% sobre cepas de *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridium perfringens*. Os resultados mostraram que, através da padronização do método da macrodiluição em caldo, a clorexidina foi a droga que demonstrou melhor eficiência, com as menores concentrações inibitórias mínimas, seguida pelo detergente de mamona, paramonoclorofenol canforado e do hidróxido de cálcio. Nota-se que a eficácia das drogas testadas variou para as diferentes espécies de bactérias, sendo que o *Clostridium perfringens* exibiu maior resistência que a *Prevotella intermedia* e o *Fusobacterium nucleatum*, cujas concentrações bactericidas mínimas foram semelhantes para as substâncias testadas[42].

Outros trabalhos foram feitos com polímero de mamona, tais como do de GARCIA JR. em 2000, que avaliou o reparo ósseo nos defeitos cirúrgicos realizados na parede anterior do seio maxilar após osteotomia e colocação de implantes de polietileno poroso de alta densidade (Medpor), de poliuretana de mamona e de matriz óssea desmineralizada bovina. As análises histológicas e histométricas foram feitas pelo método de microscopia óptica computadorizada e evidenciaram que o melhor comportamento foi visto no grupo da matriz óssea bovina, seguido pelo Medpor e da poliuretana de mamona, que respondeu com exuberante fibrose e infiltrado inflamatório tardio[43].

LEONARDO et al. (2001), analisaram in vitro a atividade antimicrobiana do detergente de mamona (Endoquil), frente às cepas de bactérias das espécies *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epdermidis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Gram positivas), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aerugiosa* (Gram negativas) e ao fungo *Candida albicans*. As outras substâncias usadas foram a clorexidina a 2% e o hipoclorito a 0,5%. O inóculo dos microrganismos foi obtido em caldo de BHI e Muller Hinton incubados a 37% por dois dias. Sobre as placas de Petri foram colocados os discos de papel com as substâncias a serem testadas, sendo assim incubadas a 37º C por 24 horas. Os halos de inibição evidenciaram o potencial antimicrobiano das substâncias e os resultados

mostraram que todos os microrganismos foram inibidos pela clorexidina, ao passo que o Endoquil mostrou-se eficaz contra o grupo dos Gram positivos e o hipoclorito foi eficaz contra o *Staphylococcus aureus*[44].

Mudando um pouco o enfoque das pesquisas, TEIXEIRA et al. (2001) estudaram a capacidade de remoção da *smear layer* dos canais radiculares empregando várias substâncias irrigantes, dentre eles o EDTA a 17%, o hipoclorito de sódio a 5,25% e o Endoquil, adotando a água destilada como grupo controle. Na análise da microscopia eletrônica de varredura observaram que os grupos que foram instrumentados com Endoquil e EDTA mostraram maior remoção da *smear layer*, sem diferenças estatisticamente significantes[45].

YAMASHITA et al em 2004, pesquisaram a superfície dentinária após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares, usando diferentes esquemas de irrigação, usando também a microscopia eletrônica de varredura[46]. Utilizaram o hipoclorito de sódio a 2,5%, o hipoclorito de sódio a 2,5% e EDTA, a clorexidina a 2%, a clorexidina a 2% e o EDTA, o detergente de mamona e o detergente de mamona mais o EDTA. Observaram que as paredes dentinárias apresentaram menos resíduos quando a toalete final foi feita com EDTA, ao passo que as três substâncias irrigantes se comportaram de forma semelhante, com melhores resultados para o terço médio dos canais. Sugerem que o detergente de mamona pode ser usado como irrigante endodôntico em novas pesquisas.

Ainda em 2004, FREITAS LEONEL et al. avaliaram a ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea, utilizando um grupo de 45 ratos, nos quais foram feitos defeitos no arco zigomático, defeitos estes preenchidos com o polímero de mamona. Após períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram sacrificados e foi feita a análise histológica. Após 120 dias alguns fragmentos do polímero podiam ser vistos, em contato direto com o tecido ósseo neoformado, que era do tipo lamelar estruturado. O crescimento de tecido ósseo conduzido sobre o polímero de mamona comprova sua osteocondução, demonstrando que este material pode ser utilizado para o preenchimento de defeitos ósseos, ajudando no processo cicatricial[47].

SIQUEIRA, em 2005 avaliou *in vivo* a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10% (Endoquil) na irrigação de canais radiculares em 18 dentes anteriores humanos com

polpa necrosada e lesão periapical constatada radiograficamente. Foram feitas três colheitas microbiológicas, paralelamente à instrumentação e irrigação. A clorexidina a 2% e o detergente derivado do óleo de mamona a 10% tiveram resultados melhores que os do hipoclorito de sódio a 1%, em relação à presença bacteriana. O interessante deste trabalho é que o aumento do número de bactérias da 1ª para a 3ª colheita indica que só o preparo biomecânico não foi suficiente para conter a recolonização dos microrganismos, e em relação à terceira colheita (em anaerobiose)[48].

Ainda em 2005, DONTOS avaliou a biocompatibilidade do chamado "Fio Lifting Biológico", fio serrilhado de poliuretana de óleo de mamona, além de sua eficácia no rejuvenescimento facial. O trabalho teve suas etapas: na primeira foram implantados fios de poliuretana no dorso de camundongos, sacrificados em intervalos de 3, 7 , 15 e 30 dias, com análise histológica por microscopia ótica; na segunda etapa, os fios foram implantados na face de pacientes (humanos) com flacidez dérmica, avaliando os resultados após sete e 60 dias. A análise histológica mostrou rápida integração do fio ao tecido subcutâneo dos ratos, com formação de colágeno e, as fotografias dos pacientes evidenciaram maior firmeza na derme além do rejuvenescimento facial, comprovado por análise computadorizada[49].

KAHIL et al. em 2009 analisaram algumas propriedades físico químicas do Endoquil, no intuito de inferir o seu comportamento como substância irrigadora nos canais radiculares. Foram avaliados: densidade, pH, tensão superficial, viscosidade e capacidade de umectação, sendo que os resultados mostraram que esta substância pode ser usada como irrigante endodôntico, mesmo apresentado uma elevada viscosidade, proveniente da extração de ácidos graxos da semente da mamona[50]. Entretanto esta característica não interfere na capacidade de limpeza dos canais, por ser um tensoativo de elevada capacidade umectante, apresentado um pH biocompatível (em relação aos tecidos apicais).

O barbatimão, cujo nome científico é *Stryphnodendron adstringens*, possui vários nomes populares, tais como: abaramotemo, barba-de-timão, barbatimão, charãozinho- roxo, ibatimô, uabatimó, casca-da-virgindade ou casca da mocidade[51] e é uma planta típica do Cerrado brasileiro (CAMARGO, 1985). A espécie também apresenta sinônimos: *Mimosa barba de timan* Vellozo, *Acacia adstringens* Mart.,

Stryphnodendron barbatimao Mart., *Stryphnodendron barbatiman* Mart., *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Mart. (Index Kewensis, 1885)[52].

A árvore do barbatimão possui cerca de 4 metros de altura, com tronco de 20 a 30 centímetros de diâmetro, possuindo ramos tortuosos, de casca rugosa, folhas bipinadas de 5 a 8 jugos, folíolos alternados de 6 a 8 jugos, sendo que seus frutos são vagens do tipo séssil e grossa de 10 centímetros de comprimento e pequenas flores avermelhadas dispostas em forma de espiga[53]. O florescimento é geralmente em setembro, e pode ir até novembro; já os frutos amadurecem nos meses de julho a setembro[54] (Figuras 2,3 e 4).

Figura 2 – Árvore do barbatimão *(Stryphnodendron adstringens)*

Fonte: Acervo pessoal do próprio autor

Figura 3- Folhas do barbatimão em destaque

Fonte: Acervo pessoal do próprio autor

Figura 4- Aspecto da casca e do caule avermelhado do barbatimão

Fonte: Acervo pessoal do próprio autor

A casca do barbatimão, com fica claro na figura 3, fornece uma substância vermelha, que é utilizada para produzir tintas de escrever ou para tingir tecidos, além de possuir efeito adstringente, aproveitado pelas indústrias de curtume (CORREA, 1984)[53]. O uso popular estende-se para outras funções, fazendo com que muitas pessoas utilizem o barbatimão como cicatrizante, adstringente, antiinflamatório, hemostático, anti-séptico, anti-diaréico, no tratamento de úlceras, anti-hipertensivo, hemorragias vaginais e até gonorréia.

Na Farmacopéia Brasileira (1959), o barbatimão aparece como contendo cerca de 20% de tanino na sua casca. Outras substâncias presentes, constituintes químicos já estudados[60] são: alcalóides, flavonóides, terpenos, estilbenos, esteróides e inibidores de tripsina e de proteases (VASCONCELOS, et al. 2004). Os flavonóides fazem parte de uma classe importante de compostos fenólicos de origem natural, dentre os quais temos os ácidos flavânicos, que podem polimerizar-se, formando os taninos[55].

Em 1989, BITTER et al. avaliaram a capacidade de limpeza do ácido tânico a 25% na superfície dentinária em dentes que foram instrumentados com limas do tipo manual[56]. Relatam que o ácido tânico tem sido usado em queimaduras desde 1925, sendo demonstradas propriedades adstringentes por coagulação ou precipitação de proteínas. Comparando o efeito do ácido tânico com o do peróxido de hidrogênio e o do hipoclorito de sódio, ficou evidente, através de análise no microscópio eletrônico, que a

solução do ácido tânico a 25% removeu *smear layer* de forma mais eficiente do que os outros irrigantes.

Em 1990, BITTER usou novamente uma solução contendo ácido tânico a 25%, visando avaliar o efeito da permeabilidade de dentina preparada tratada com este ácido e com uma solução de ácido cítrico a 6%. Azul de metileno foi aplicado na superfície da dentina depois da aplicação das soluções para avaliar a penetração nos túbulos dentinários. A solução de ácido tânico a 25% removeu *smear layer* e inibiu a penetração do corante utilizado, segundo os parâmetros da pesquisa, que se utilizou de microscopia eletrônica de varredura para analisar as amostras[57].

A atividade antiinflamatória do Barbatimão foi testada por LIMA et al. em 1997, usando ratos em modelos de inflamação aguda e crônica. Utilizou-se uma solução de barbatimão (solvente acetona) que se mostrou eficaz em diminuir o edema inflamatório induzido por carragenina e dextrana, sendo que esta ação anti-edema foi comparável a produzida pelo indomethacin e pelo cyproheptadine, drogas de referência usadas no trabalho. A solução de barbatimão usada mostrou-se efetiva assim como o phenylbutazone, um conhecido antiinflamatório não-esteroidal. A análise fitoquímica nessa fração (contendo acetona) do barbatimão demonstrou a presença de muitas substâncias, como taninos e tripertenos cujo poder antiinflamatório é conhecido. Sugerem que novos estudos são necessários para isolar as substâncias e determinar seus mecanismos de ação[58].

Já AUDI et al. estudaram, em 1998, a ação antiulcerativa do *Stryphnodendron adstringens* em ratos, utilizando-se de métodos de indução de lesões gástricas que são tipicamente conhecidos por causarem úlceras em humanos, tais como: etanol-acidificado, stress agudo e drogas antiinflamatórias não-esteroidais. Nesse experimento, o extrato da planta e suas frações preveniram injúria gástrica aguda induzida pelo stress e etanol-acidificado. Os extratos tiveram uma significante proteção celular contra lesões gástricas induzidas por agentes necrosantes. Sugeriram que a substância tem efeito protetor diretamente na mucosa gástrica[59].

Utilizando um extrato etanólico, porém de própolis, REIS et al. em 2000, avaliaram a sua atividade antiinflamatória sobre o edema desencadeado pela carragenina e dextrana, e também pela histamina. O extrato etanólico de própolis (EEP) inibiu o processo inflamatório desencadeado pela carragenina, mas o mesmo não aconteceu com

a dextrana. Houve efeito antagônico do EEP em relação ao efeito produzido pela histamina. As úlceras foram induzidas segundo o método de Rainsford e Whitehouse, e a dose teste do EEP foi de 650mg/kg. Os resultados obtidos, sugere que o EEP apresenta efeito antiinflamatório que se assemelha ao dos antiinflamatórios não-esteroidais, mas com relação aos danos na mucosa gástrica (e em relação aos níveis sangüíneos), o extrato não mostrou interferir sigificativamente[60].

Em 2000, RATES publicou um artigo no qual ele discute o ensino da Farmacognosia, que etmologicamente significa o conhecimento (*gnose*) dos fármacos ou venenos (*pharmacon*). Nesse trabalho ele apresenta dados sobre a comercialização e utilização racional de produtos naturais, sendo que um dos pontos fortes de seu texto é o trecho que diz que entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) 11% são de origem exclusivamente vegetal e outra parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos, porém obtidos de precursores vegetais. Outro dado importante, no tocante às recomendações para seleção e aquisição de matérias-primas vegetais, é que se deve dar preferência por espécies vegetais aprovadas por organismos regulamentares e científicos, tais como Farmacopéias, OMS, ESCOP, CYTED, TRAMIL, investindo, dessa forma, no controle de qualidade[61].

PAIXÃO et al. em 2002 mostraram que o uso de plantas medicinais, como o a uva, o pepino e o barbatimão podem ser uma opção viável para o tratamento de afecções bucais como a gengivite, a pericoronarite e as aftas menores. O barbatimão é usado fervendo-se 15 cm da sua casca em um copo de água (chá por decocção) e com esta solução devem-se fazer bochechos três vezes ao dia. As propriedades da planta sugerem que pode ser usada como anti-séptico local, antiinflamatório, antidiarrêico, diurético e no tratamento de leucorréia[62].

Também em 2002, COSTA et al. estudaram o efeito da infusão de barbatimão em células do sangue marcadas pelo technetium-99m, utilizando ratos *Wistar* e diferentes concentrações de barbatimão. Todas as concentrações da planta diminuíram o efeito dos marcadores das células vermelhas, provavelmente devido às suas propriedades de oxi-redução e/ou por funcionar como quelante do agente redutor cloreto estanoso (quelando o íon estanoso)[63].

A atividade tripanocida de *Stryphnodendron adstringens* e de *Caryocar brasiliensis* foi avaliada por HERZOG-SOARES et al. em 2002. Ressaltaram as características marcantes do barbatimão, ou seja, seus altos teores de taninos, capacidade de complexação com proteínas e seu poder de seqüestrar íons metálicos, principalmente ferro, íons esses fundamentais ao desenvolvimento de microrganismos. Além disso, os autores relataram a atividade antioxidante decorrente da inativação de radicais livres. Os extratos brutos etanólicos usados nessa pesquisa foram confeccionados a partir das cascas das plantas mencionadas, usados sobre a fase aguda da parasitemia, após inoculação *in vivo* de camundongos pela cepa Y do *Trypanosona cruzi*. Os resultados mostraram uma interferência na curva de parasitemia, reduzindo o número de parasitas no sangue, mesmo não havendo eficácia total sobre eles, o que indica que novos estudos devem ser realizados no intuito de combater a doença de Chagas (e outras parasitoses) com tratamentos que ofereçam menos efeitos tóxicos ao hospedeiro[64].

Em 2003, analisando a quantidade de taninos totais de plantas aromáticas e medicinais no Rio Grande do Sul, PANSERA et al. verificaram que a espécie *Lippia alba* apresentou 18,9% de taninos totais (porcentagem equivalente ao ácido tânico), valor maior do que o da goiabeira (*Psidium guajava*) que obteve 13 a 17% e semelhante ao do araçá-pitanga (*Psidium ruum*), que foi de 20%. Para estes autores, ficou evidenciado que a quantidade de taninos totais é característica de cada espécie e não da quantidade total de extratos solúveis, pois folhas como as da *Lavandula dentata*, apesar de terem apresentado uma das maiores solubilidades em metanol, produziram menores valores de taninos totais, não havendo, dessa maneira, correlação direta entre teor de extratos totais e teor de taninos totais na planta, até porque existem inúmeros outros compostos que podem estar presentes no extrato em questão[65].

MARTINS et al.,2003 compararam o efeito cicatrizante de três substâncias: barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*), calêndula (*Calendula officinalis*) e confrey (*Symphytum officinale*) em feridas provocadas cirurgicamente em seis eqüinos machos[75]. Foram realizadas quatro lesões na região lombar dos animais, as quais foram tratadas diariamente com as soluções das plantas citadas, sendo feita mensuração do halo da ferida a cada três dias. A avaliação macroscópica mostrou que, na fase inflamatória, as feridas tratadas com calêndula mostraram bordos menos edemaciados, ao passo que o barbatimão fez com que houvesse formação de crostas espessas,

irregulares e secas, provavelmente pela ação adstringente dos taninos[66]. Além disso, houve produção de exsudato serofibrinoso, com deposição de fibrina no sítio da lesão. A baixa tensão de oxigênio e o acúmulo de fibrina na parte central da lesão estimulam a multiplicação e migração centrípeta de fibroblastos pela malha fibrinosa, sugerindo dessa forma que o barbatimão favoreceu o processo de fibroplastia. No grupo tratado com confrey o segundo momento de biópsia do estudo mostrou tecido de granulação e infiltrado leucocitário, o que prejudicou o processo cicatricial. Tendo em vista os resultados obtidos, o barbatimão mostrou-se superior a todos os grupos testados, seguido pela calêndula.

A atividade antioxidante e antifúngica de extratos contendo taninos de *Stryphnodendron obovatum* Benth. foi avaliada por SANCHES et al. (2005) usando o método DPPH em cromatografia em camada delgada e pela concentração fungicida mínima (CFM) frente às leveduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis.* O extrato bruto e as frações etanólicas e aquosa, assim como as subfrações cromatográficas foram inativas frente às leveduras testadas. Somente as frações F16-19 e F21-22 mostraram boa atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Em relação à capaciade antioxidante todas as frações testadas mostraram capacidade de reduzir o radical DDPH[67].

O extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens* e frações cujas concentrações variaram entre 100 e 5000µg/ml demonstraram um efeito inibitório do tipo dose-dependente no crescimento do protozoário *Herpetomonas samuelpessoai*, fazendo com que houvesse um decréscimo na atividade da enzima succinato citocromo c redutase, um conhecido marcador da mitocôndria, relacionado ao seu metabolismo. Esse estudo, feito por HOLETZ et al. (2005) utilizou-se do *H. samuelpessoai*, um protozoário não patogênico mas pertencente à família Trypanosomatidae, que inclui espécies que oferecem risco aos seres humanos como o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.*, servindo dessa maneira como um modelo interessante para testar novas drogas contra protozoários patogênicos[68].

FELIPE et al. (2006) em outro estudo usando extrato bruto do barbatimão e da *Guazuma ulmifolia*, assim como as suas frações aquosa e alcoólica, mostraram atividade antiviral contra o polivírus 1(P-1) e contra o herpes bovino (BHV-1). As maiores porcentagens de inibição viral foram da *G. ulmifolia*, inibindo 100% das amostras de

BHV-1 e 99% das amostras de P-1, enquanto que a fração aquosa do barbatimão foi a mais efetiva em relação ao extrato bruto, inibindo 97% das amostras de BHV-1 e 93% das amostras de P-1. Os autores concluíram que as substâncias testadas foram eficazes contra os vírus, muito embora não tenha ficado clara a natureza dos componentes antivirais. Sugerem a necessidade de outros trabalhos na identificação e classificação desses compostos químicos[69].

ISHIDA, et al. (2006) utilizou uma fração hidroalcoólica do barbatimão (subfração F2.4) para testar sua atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida sp*. de amostras obtidas do fluido vaginal de mulheres sem histórico de imunodeficiência e duas cepas padronizadas (*C.albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). O fluconazol e a nistatina foram usados como drogas de referência (grupo controle). Os resultados mostraram que a fração F2.4 do barbatimão obteve o melhor resultado das substâncias testadas em concentrações acima de 7,8mg/L, comparável ao resultado da nistatina. Os extratos do barbatimão mostraram baixa toxicidade frente aos macrófagos e células vermelhas do sangue e sua ação antifúngica foi atribuída aos taninos condensados, que afetaram a integridade das células das leveduras estimulando também a fagocitose por parte das células macrofágicas. Os autores sugeriram novos estudos para que as propriedades dos taninos do barbatimão possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos[70].

Em 2009, ISHIDA et al. verificaram a atividade antifúngica dos taninos do barbatimão (*Stryphnodendron adsringens*) frente ao *Cryptococcus neoformans*, uma levedura que causa cryptocose, uma enfermidade comum em paciente imunocomprometidos, que atinge os pulmões e outros comprometimentos sistêmicos, como a meningoencefalite. A fração do extrato usada foi a F2.4 que já tinha sido usada em outro trabalho, além dos grupos controles, que foram o fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Os resultados mostraram que assim como para a *C. albicans* o barbatimão mostrou atividade antifúngica, interferindo a homeostase celular e no crescimento das leveduras, além de interferir na formação da cápsula de polisacarídeo e pigmentação do da espécie. A fração F2.4 ainda apresentou baixa citotoxicidade frente a celulas mamárias[71].

Ainda em 2009, MELO e SILVA et al. avaliaram o potencial antifúngico de plantas do cerrado brasileiro, usando o teste de difusão contra as espécies *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*[72]. Um total de 57 extratos foi preparado para este trabalho, sendo que entre eles estava o barbatimão. Comparando com outros estudos, como os de ISHIDA[70,71], este estudo verificou baixa atividade para o extrato de barbatimão, fato este atribuído às diferenças da concentração usada, ao solvente utilizado para a extração das substâncias, à idade da planta, as partes que foram usadas e ao período de coleta das espécies. Apesar desse fato, de um modo geral, os resultados obtidos com as plantas estudadas permitiram afirmar que estudos como esse podem dar início à seleção de materiais biocompatíveis para serem usados na síntese de novas drogas, que podem ser usadas na cura de várias enfermidades.

Nesse sentido, para cada nova substância descoberta, em se tratando de Endodontia, surge uma série de expectativas com relação à atividade antimicrobiana que essa descoberta apresenta, principalmente se a intenção é usá-la no interior do sistema de canais radiculares, um ambiente repleto de microrganismos patogênicos.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é avaliar comparativamente a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville (barbatimão), detergente derivado da mamona a 10% (Endoquil) e da clorexidina, em bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas, utilizando o método de difusão em ágar (técnica do cilindro) e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica da microdiluição.

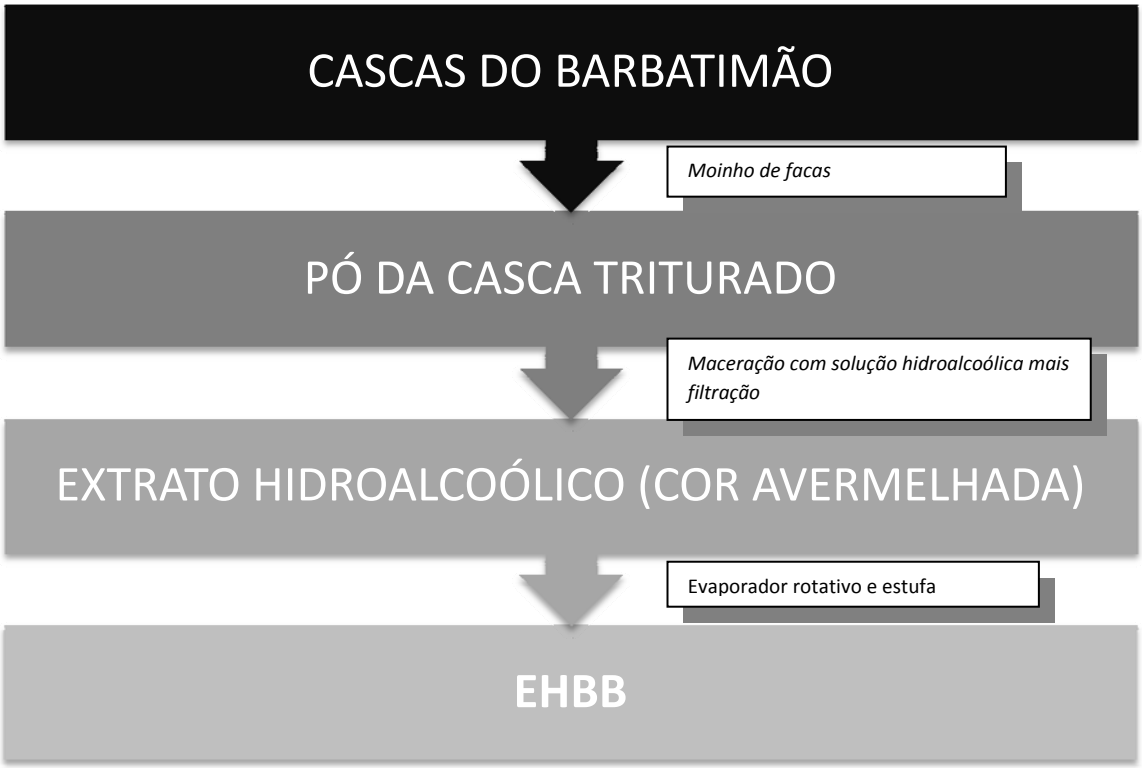
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das substâncias utilizadas

Para este trabalho, o extrato hidroalcoólico bruto do barbatimão (EHBB) foi fornecido pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada à Pesquisa (Lapema) da Universidade de Franca (UNIFRAN). Para sua obtenção, foram seguidos os protocolos de coleta, trituração, maceração, filtragem e utilização de evaporador rotativo, com pressão reduzida, com temperatura aproximada de 45º C para evaporação do solvente, obtendo-se assim um extrato bruto viscoso, que foi levado para estufa finalizando o processo de secagem, obtendo-se dessa forma o EHBB seco[73].

Apresentamos o fluxograma 1 que representa didaticamente esse processo:



Fluxogama 1- Obtenção do extrato de barbatimão

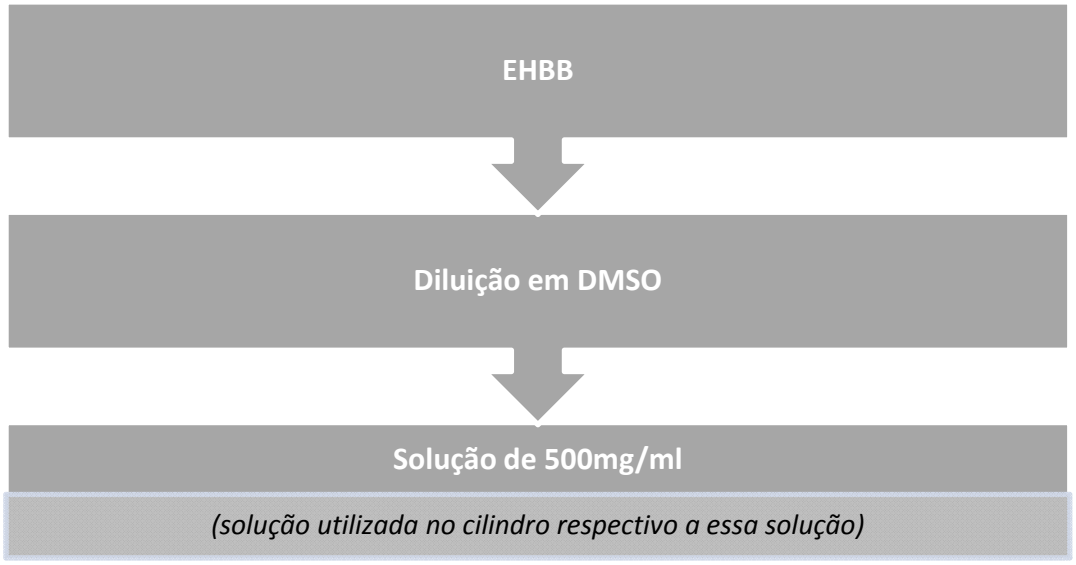
A solução do detergente do óleo de mamona a 10% ou Endoquil®, foi obtida diretamente do laboratório do professor Gilberto Orivaldo Chierice, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP), em frasco âmbar, contendo inicialmente 1 litro da solução do produto. A solução de clorexidina a 2% usada neste trabalho também foi fornecida pelo laboratório de microbiologia aplicada à pesquisa (Lapema) da Universidade de Franca (UNIFRAN).

3.2 Preparo das soluções

3.2.1 Preparo das soluções para o método de difusão em ágar (técnica dos cilindros)

Para o teste de difusão em ágar, também conhecido como teste de difusão em placas, foi usada uma concentração de 500mg/ml, ou seja, 500mg do EHBB para 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido; Vetek Química Fina Ltda).

O fluxograma a seguir mostra o processo:



Fluxograma 2- Processo de elaboração da concentração para o teste de difusão

As demais soluções, incluindo as usadas como grupo controle, foram colocadas nas suas respectivas concentrações diretamente nos cilindros usados para o teste de difusão, como será descrito posteriormente.

3.2.2 Preparo das soluções para a determinação da concentração inibitória mímina (CIM ou MIC)

Para a determinação da CIM, a concentração inicial da solução-mãe, isto é, a solução de trabalho, foi de 2500µg/ml, sendo que para o preparo dessa solução foi necessário diluir 5 mg do barbatimão em 125 µL de DMSO = [40.000 µg/mL]. Posteriormente, diluiu-se 125 µL desta solução para 1875 µL de caldo Schaedler[74] = [2.500 ug/mL]. No poço (da microplaca), a concentração inicial do primeiro poço foi de 2.000 µg/mL, ou seja, o seu protocolo iniciou com 2.000 µg/mL e foi até 100 µg/mL. Quanto ao Endoquil usado na determinação da CIM, ele já estava na concentração de 10%, assim seria uma concentração total de 100.000 µg/mL. Então, diluimos 50 µL desta solução de Endoquil para 1500 µL de caldo Schaedler, para assim obtermos também a concentração de 2.500 µg/mL (solução mãe).

Da mesma forma que no uso do barbatimão, o protocolo utilizado para a determinação da CIM foi de 2000 a 100 µg/mL, assim, o primeiro poço também começou com uma concentração de 2000 µg/mL.

3.3 Avaliação antimicrobiana

3.3.1 Microrganismos estudados

Para este trabalho foram utilizadas cepas padrão, adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC) e cepas de campo, ou seja, isoladas a partir de fontes humanas, cuja procedência e cultivo foram feitos pelo Lapema, da Universidade de Franca (UNIFRAN). Podemos visualizar as cepas na Tabela 1.

Tabela 1- Cepas utilizadas, mostrando origem, grupos e gêneros bacterianos.

Cepas	Origem	Grupo/Gênero
Prevotella nigrescens	ATCC 33563	**Bactéria anaeróbia*** **Bastonete Gram-negativo**
Actinomyces naeslundii	Cepa de campo - 20	**Bactéria anaeróbia** **Bastonete Gram-positivo**
Actinomyces naeslundii	ATCC 19039	**Bactéria anaeróbia** **Bastonete Gram-positivo**
Porphyromonas gingivalis	Cepa de campo - 100	**Bactéria anaeróbia** **Bastonente Gram-negativo**
Porphyromonas gingivalis	ATCC 33277	**Bactéria anaeróbia*** **Bastonente Gram-negativo**
Enterococcus faecalis	ATCC 4082	**Bactéria anaeróbia facultativa** **Coco Gram-positivo**
Enterococcus faecalis	Cepa de campo - 25	**Bactéria anaeróbia facultativa** **Coco Gram-positivo**
Haemophilus actinomycetemcomitans	ATCC 43717	**Bactéria anaeróbia facultativa** **Bastonete Gram-negativo**

*Estas espécies sofreram mudanças em relação à taxonomia e são tidas como Bacteroides Melaninogenicus, segundo consta em MACHADO, 2007[75].

3.3.2 Método da difusão em ágar

O teste para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar foi realizado baseado na técnica do cilindro, seguindo as orientações de GROOVE e RANDALL (1955)[76], em triplicata.

3.3.2.1 Preparo do meio de cultura

Preparou-se 500mL de ágar Schaedler, desidratado (Difco, Michigan, USA) na proporção de 19g/500mL de água deionizada, conforme as especificações do fabricante, permanecendo o material em repouso, em temperatura ambiente para hidratar. A seguir, este material foi esterilizado em autoclave, a 122º C, por 20 minutos, deixando-se resfriar até a temperatura aproximada de 45-50º C. Com auxílio de pipeta de vidro graduada esterilizada, dispensaram-se em placas de petri de 150 x15mm, 25mL do ágar em capela de fluxo laminar.

Foram preparados 18 tubos de ensaio medindo 20 x 200mm, contendo 12,5 mL de ágar e 18 tubos de ensaio de 10x100mm, contendo 2,5mL de caldo Schaedler, conforme orientação do fabricante.

Para o preparo do caldo Schaedler, suplementado com vitamina K (BD; Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152), foram dissolvidos 28.41 gramas em 1000mL de água destilada. Em seguida, foi fervido com pequena agitação para dissolver o meio completamente. O caldo foi esterilizado em autoclave a 15 lbs de pressão (121ºC), por 15 minutos. Após esfriar, o caldo foi bem misturado antes que fosse dispensado para o teste. O superaquecimento e a fotooxidação do meio devem ser evitados pois isso pode retardar o crescimento das bactérias[74].

O caldo Ágar Sangue, para crescimento em microaerofilia do *Enterococcus faecalis*, tem em sua composição peptona bacteriológica 10,0 g/L; extrato nutritivo 10,0 g/L; cloreto de sódio 5,0 g/L; agar 15,0 g/L; sangue de carneiro desfibrinado a 7 %; água para 1 L. As placas foram inoculadas por inundação de superfície e incubadas por cerca de 35º C (± 2ºC) por 48 horas. Foram usados 6 tubos de ensaio de 10 x100mm, contendo 2,5mL deste caldo, para as duas amostras de *E. faecalis* (ATCC e campo).

3.3.2.2 Preparo do inóculo bacteriano

Utilizando-se uma alça de platina esterilizada, inoculou-se cada microrganismo testado (n=8, Tabela 1), em tubo de ensaio previamente preparado com 2,5 mL de caldo Schaedler , partindo-se de culturas recentes até atingir a turbidez do tubo de 0,5 da escala de MacFarland (MF) para bactérias.

3.3.2.3 Controles utilizados

Como controle positivo, foi usado um antimicrobiano de referência, respeitando o perfil de sensibilidade dos grupos e/ou individualidade dos microrganismos, ao passo que, como controle negativo, pode-se considerar a água (deionizada, esterilizada). Assim, podemos agrupar da seguinte forma:

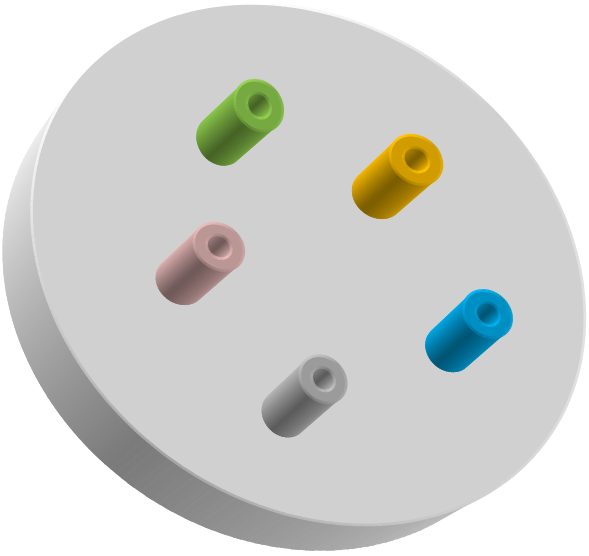
a) controle positivo: cilindro contendo solução de clorexidina a 0,12% (Periogard®, Colgate)

b) controle negativo: cilindro contendo água

3.3.2.4 Seqüência da técnica

Todo o inóculo presente no tubo de ensaio previamente preparado com 12,5mL de ágar, foi misturado e vertido sobre a placa de petri com a camada de ágar-base, sendo deixado em temperatura ambiente para que solidificasse. Com auxílio de pinças esterilizadas foram colocados os cilindros de aço inoxidável (medindo 8 x 10mm, com 6mm de diâmetro interno) para que fossem colocados 100µL de cada uma das soluções em estudo em cada cilindro. Foi respeitada uma distância de cerca de 1,5 cm entre um cilindro e outro.

No primeiro cilindro, dispensou-se 100µL do EHBB na concentração de 500mg/mL, no segundo cilindro dispensou-se 100µL da solução de Endoquil (detergente de mamona a 10%), no terceiro cilindro dispensou-se 100µL da solução de clorexidina a 2%, no quarto cilindro dispensou-se 100µL de DMSO e no quinto e último cilindro, dispensou-se 100µL de água (Fluxograma 3).



Fluxograma 3- Disposição das substâncias em cada cilindro da placa (cilindro verde= EHBB; laranja= Endoquil; azul-celeste=clorexidina; cinza=DMSO; rosa=água)

Em seguida, as placas foram mantidas em estufa a 35º C por cerca de 24horas, sendo que o halo de inibição que apareceu ao redor dos cilindros foi medido em milímetros, através do uso de régua milimetrada, sendo considerado o valor médio dos halos da triplicata. A seguir, a figura5 nos mostra a seqüência do teste de difusão, pela técnica do cilindro.

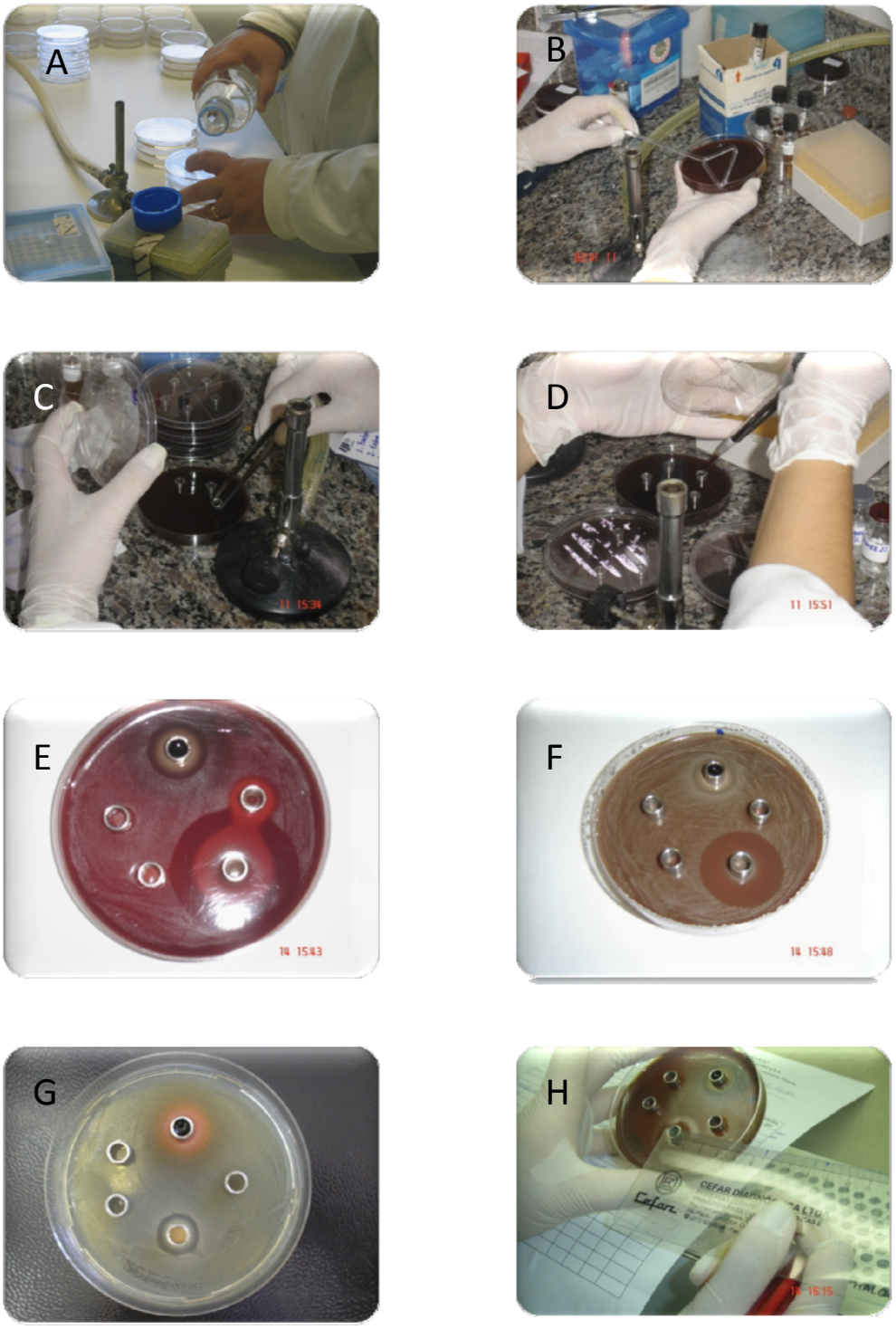


Figura 5 – Esquema mostrando a técnica de Difusão em placa (A- preparo das placas de petri,http://portal.ipvc.pt; B- início da inoculação das placas; C-colocação dos cilindros de aço; D- inserção das substâncias nos cilindros; E- placa mostrando os halos de inibição para o *Enterococcus faecalis;* F-placa mostrando os halos de inibição para o *Prevotella nigrescens;* G-placa mostrando os halos de inibição para o *Porphyromonas gingivalis;* H-mensuração dos halos de inibição com régua milimetrada)

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima das soluções foi feita segundo a técnica de diluição em caldo (microtécnica) descrita por ANDREWS (2001) com adaptações[77].

3.4.1 Preparo das soluções

Para a determinação da CIM, a concentração inicial da solução-mãe do *S. adstringens*, isto é, a solução de trabalho, foi de 2500µg/ml, sendo que para o preparo dessa solução foi necessário diluir 5 mg do extrato de barbatimão em 125 µL de DMSO = [40.000 ug/mL]. Posteriormente, diluiu-se 125 µL desta solução para 1875 µL de caldo Schaedler = [2.500 ug/mL]. No poço da microplaca, a concentração inicial do primeiro poço foi de 2.000 µg/mL, ou seja, o seu protocolo iniciou com 2.000 µg/mL e foi até 100 µg/mL. Quanto ao Endoquil (solução de *R. communis*) a solução já estava na concentração de 10%, assim seria uma concentração total de 100.000 µg/mL. Então, diluímos 50 µL desta solução de Endoquil para 1500 µL de caldo Schaedler, para assim obtermos também a concentração de 2.500 µg/mL (solução mãe), a mesma concentração da solução-mãe do barbatimão.

3.4.2 Preparo dos controles utilizados

Os controles utilizados foram:

a) controle positivo: solução de clorexidina 0,2%, preparada a partir do pó de clorexidina, com o qual foi preparada uma solução de estoque de concentração de 10mg/mL, e a partir dessa solução preparou-se por diluição uma solução-mãe de 20µg/ml. Para o primeiro poço da microplaca, utilizou-se uma concentração de clorexidina de 5,9µg/mL que foi diminuindo de concentração (pela técnica da microdiluição) até 0,0115µg/mL.

b) controle negativo: utilizou-se água, meio de cultura (Schaedler e TSB) e DMSO.

3.4.3. Preparo do inóculo bacteriano

Com auxílio de alça de platina esterilizada, transferiram-se as culturas dos microrganismos, desenvolvidos no ágar para tubos contendo caldo Schaedler (bactérias anaeróbias) e caldo TSB (*E. faecalis*, anaeróbio facultativo). Padronizou-se o inóculo fazendo a comparação deste com o tubo de 0,5 da escala MF equivalente a 1,5 x 10^8 UFC/mL para as bactérias.

3.4.4. Procedimento

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, com os devidos cuidados necessários, sendo que as vidrarias, as ponteiras e os meios de cultura foram previamente esterilizados.

Foram utilizadas microplacas com 96 orifícios, sendo que cada orifício recebeu o inoculo, caldo Schaedler e caldo TSB (de acordo com as bactérias usadas) e amostras das soluções-mães preparadas, de tal maneira que o volume final em cada orifício foi de 100µL.

As diversas concentrações avaliadas variaram de 100µg/mL a 2000µg/mL (barbatimão e endoquil) nos caldos Schaedler/TSB. Determinou-se a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados. Para os controle positivo (clorexidina), as concentrações avaliadas variaram de 0,0115µg/mL a 5,9µg/mL (nos caldos Schaedler/TSB). As microplacas foram seladas com filme PVC (Magipack) e incubadas 35º C por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, em cada orifício foram adicionados 30µL de resazurina (Sigma), preparados em solução aquosa (0,01%) para as bactérias (PALOMINO et al., 2002)[78]. Tal sistema revelador permite uma observação imediata, sendo que a cor azul representa ausência de

crescimento, já a cor vermelha, sua presença. A ausência de cor nos poços foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano (microrganismo foi sensível ao extrato testado). A Figura 6 ilustra a seqüência técnica descrita.

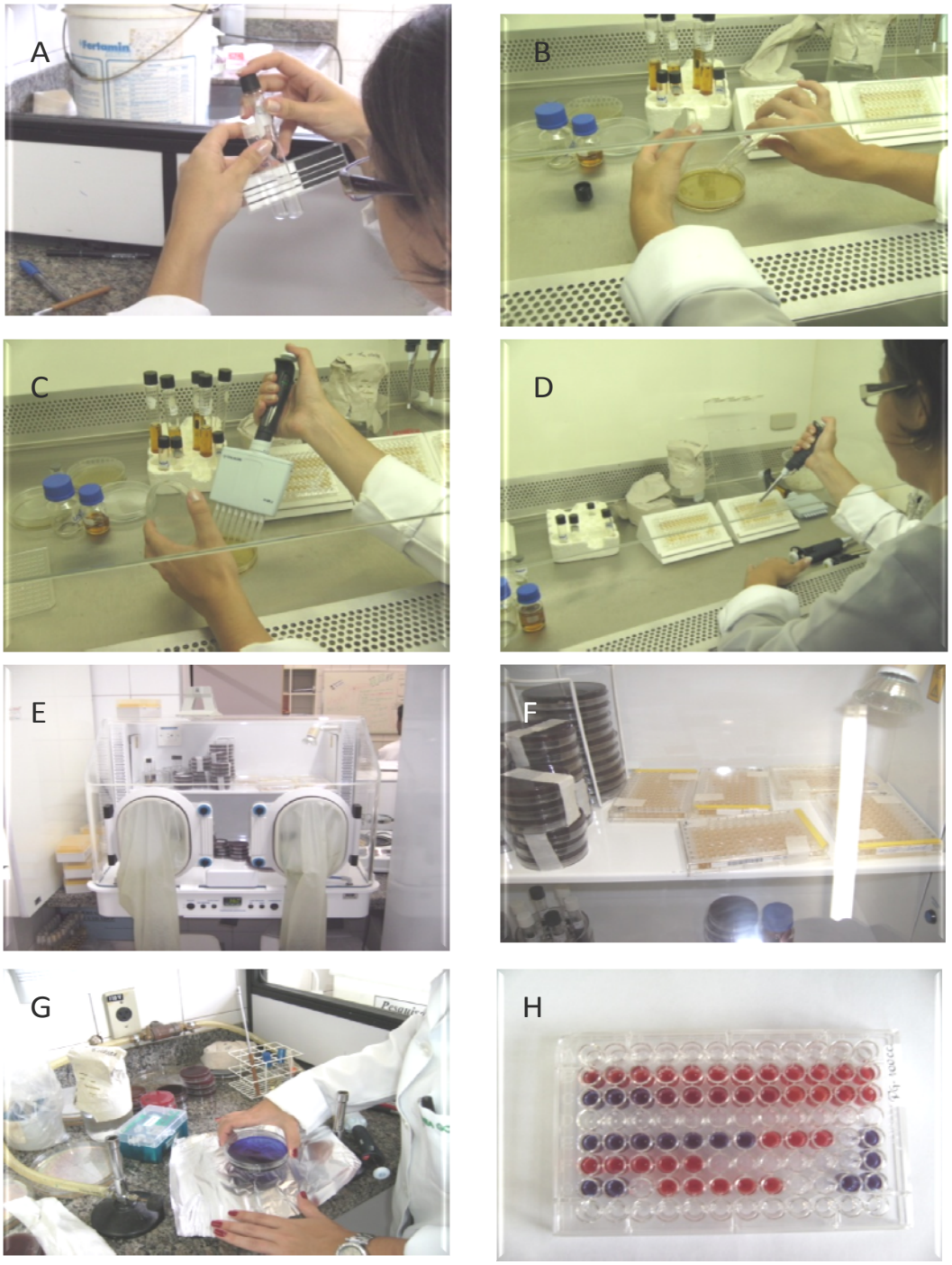


Figura 6 – Seqüência laboratorial do teste de concentração inibitória mínima (CIM). (A - Padronização do inóculo com a escala MF; B – Preparo para colocação do inóculo nas microplacas; C - Colocação dos inóculos; D – Colocação das substâncias testadas; E – Câmara de anaerobiose; F – Detalhe das microplacas na câmara; G – Preparo da resazurina (solução reveladora); H - Microplaca do *P. gingivalis* após adição da resazurina)

3.5 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios biológicos pelo método de difusão e pela determinação da concentração inibitória mínima foram submetidos à análise estatística seguindo o modelo ONE-WAY ANOVA. As amostras foram testadas em triplicata, lembrando que a partir do diâmetro dos halos de inibição (difusão em ágar) calculou-se a média e o desvio padrão da média para os experimentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados das substâncias testadas

Os resultados obtidos com os extratos de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), detergente derivado do óleo de mamona (Endoquil®), além da clorexidina, após a realização da etapa biológica *in vitro* pelo método de difusão em ágar (técnica do cilindro) e pela técnica da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), mostraram que as substâncias apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos: *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, *Actinomyces naeslundii* (cepa de campo), *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Enterococcus faecalis* (cepa de campo), *Haemophilus actinomycetemcomitans* ATCC 43717 (Tabelas 2,3 e 4).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana das soluções de barbatimão, Endoquil e clorexidina frente aos microrganismos Prevotella nigrescens (ATCC 33563), Actinomyces naeslundii (cepa de campo), Actinomyces naeslundii (ATCC 19039), pelo método de difusão em ágar (técnica dos cilindros de aço).

Microrganismo/ATCC	Substância/Concentração	Halo (mm) / Aro (mm)			Média ± DP
Prevotella nigrescens **ATCC 33563**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**23**	**21**	**22**	**22 ± 1,0**
		8	**7**	**7**	**7,3 ± 0,58**
	Endoquil 10%	**12**	**11**	**11**	**11,3 ± 0,58**
		2	**2**	**3**	**2,3 ± 0,58**
	Clorexidina 0,12%	**33**	**32**	**33**	**32,7 ± 0,58**
		13	**12**	**13**	**12,7 ± 0,58**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
Actinomyces naeslundii **Cepa de campo odont. - 20**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**13**	**11**	**11**	**11,7 ± 1,15**
		2	**2**	**2**	**2 ± 0**
	Endoquil 10%	**10**	**9**	**9**	**9,3 ± 0,58**
		1	**1**	**1**	**1 ± 0**
	Clorexidina 0,12%	**24**	**24**	**25**	**24,3 ± 0,58**
		8	**9**	**10**	**9,0 ± 1,0**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
Actinomyces naeslundii **ATCC 19039**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**18**	**16**	**16**	**16,7 ± 1,15**
		5	**4**	**4**	**4,3 ± 0,58**
	Endoquil 10%	**10**	**10**	**9**	**9,7 ± 0,58**
		2	**2**	**1**	**1,7 ± 0,58**
	Clorexidina 0,12%	**27**	**27**	**28**	**27,3 ± 0,58**
		10	**10**	**10**	**10 ± 0**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana das soluções de barbatimão, Endoquil e clorexidina frente aos microrganismos *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Microrganismo/ATCC	Substância/Concentração	Halo (mm) Aro (mm)			Média ± DP
Porphyromonas gingivalis **Cepa de campo - 100**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**12**	**12**	**12**	**12 ± 0**
		2	**2**	**2**	**2 ± 0**
	Endoquil 10%	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	Clorexidina 0,12%	**22**	**23**	**22**	**22,3 ±0,58**
		8	**8**	**7**	**7,7 ± 0,58**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	**Barbatimão 500 mg/mL**	**21**	**19**	**19**	**19,7 ± 1,15**
		7	**6**	**5**	**6 ± 1,0**
	Endoquil 10%	**16**	**15**	**12**	**14,3 ± 2,0**
		4	**4**	**2**	**3,3 ± 1,15**
	Clorexidina 0,12%	**41**	**41**	**40**	**40,7 ±0,58**
		12	**18**	**16**	**15,3 ± 3,0**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana das soluções de barbatimão, Endoquil e clorexidina frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Enterococcus faecalis (Cepa de campo) e Haemophilus actinomycetemcomitans (ATCC 43717).*

Microrganismo/ATCC	Substância/Concentração	Halo (mm) Aro (mm)			Média ± DP
Enterococcus faecalis **ATCC 4082**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**10**	**10**	**10**	**10 ± 0**
		1	**1**	**1**	**1 ± 0**
	Endoquil 10%	**9**	**9**	**9**	**9 ± 0**
		1	**1**	**1**	**1 ± 0**
	Clorexidina 0,12%	**17**	**16**	**17**	**16,7 ±0,58**
		4	**4**	**4**	**4 ± 0**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
Enterococcus faecalis **Cepa de campo odont. - 25**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**10**	**10**	**10**	**10 ± 0**
		1	**1**	**1**	**1 ± 0**
	Endoquil 10%	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	Clorexidina 0,12%	**15**	**14**	**14**	**14,3 ± 0,58**
		4	**3**	**3**	**3,3 ± 0,58**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
Haemophilus actinomycetemcomitans **ATCC 43717**	**Barbatimão 500 mg/mL**	**12**	**13**	**12**	**12,3 ± 0,58**
		2	**2**	**2**	**2 ± 0**
	Endoquil 10%	**9**	**9**	**9**	**9 ± 0**
		1	**1**	**1**	**1 ± 0**
	Clorexidina 0,12%	**16**	**17**	**16**	**16,3 ±0,58**
		4	**4**	**4**	**4 ± 0**
	DMSO	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**
	H_2O	**0**	**0**	**0**	**0 ± 0**
		0	**0**	**0**	**0 ± 0**

Para este trabalho foi usado um extrato hidroalocólico de barbatimão (EHBB), sendo importante salientar que os solventes mais utilizados para preparação de extratos são o etanol, metanol e/ou a combinação deles com água, em que a extração das substâncias ativas contra os microrganismos ocorre de maneira mais efetiva, dentre elas destacam-se os taninos, compostos fenólicos, flavonóides, terpenóides, entre outros (COWAN, 1999)[79].

Sobre a preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens*, ARDISSON et al., em 2009, verificou que após a caracterização dos extratos glicólicos de barbatimão preparados com diferentes concentrações de propilenoglicol e água, que os solventes com maiores concentrações de água conduzem a extratos mais enriquecidos em polifenóis e taninos, que têm características ácidas. A seletividade de cada sistema de solventes em extrair especificamente os taninos, prováveis constituintes ativos da droga, foi determinada a partir do cálculo da razão entre os teores totais dessas substâncias e dos resíduos secos obtidos para cada extrato, o chamado índice de seletividade. Esses resultados sugerem que o solvente de 80% de propilenoglicol é mais específico para extrair os taninos da droga vegetal, ou seja, a incorporação de 20% de água ao propilenoglicol conduz a extratos mais enriquecidos em taninos obtidos a partir das cascas do *S.adstringens*[80].

Na tabela 2, verificou-se que houve atividade antimicrobiana no método de difusão em ágar, notando-se os diferentes halos de inibição. Nesta tabela, verificou-se que para o três microrganismos testados, *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Actinomyces naeslundii* (cepa de campo), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039) os maiores halos de inibição foram da clorexidina a 0,12 (Periogard®), seguidos pelos halos de inibição do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e pelos halos do Endoquil (detergente derivado do óleo de mamona, *Ricinus communis*). A espécie mais sensível dentre as três representadas nessa tabela foi a *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), em relação às drogas testadas. Não foram detectados halos de inibição para o DMSO nem para a água.

Na tabela 3, verificou-se que para os microrganismos *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) os maiores halos de inibição foram também da clorexidina e, em segundo lugar estão os halos do barbatimão. A cepa de campo não se mostrou sensível ao detergente de mamona, não havendo halos de inibição. Segundo a tabela, o DMSO e a água também não inibiram o crescimento dos microrganismos.

Na tabela 3, os microrganismos apresentaram sensibilidade às substâncias testadas, sendo que os maiores halos de inibição foram novamente os halos referentes à clorexidina, que mostrou atividade antimicrobiana tanto para o *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Enterococcus faecalis* (Cepa de campo) e *Haemophilus*

actinomycetemcomitans (ATCC 43717). Nesta tabela ficou claro que para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (Cepa de campo), o detergente de mamona não mostrou atividade antimicrobiana, o que fica evidente em virtude da ausência de halos de inibição.

Analisando as três tabelas em conjunto, fica claro que o EHBB foi mais efetivo do que o Endoquil frente aos microrganismos testados, tendo resultados inferiores aos da clorexidina, que foi considerada controle positivo para este estudo.

Para elucidarmos melhor o que foi verificado para o teste de difusão (tabelas 2,3 e 4), vamos fazer a representação gráfica dos dados da tabela, analisando o desvio padrão das médias dos halos das amostras (Gráfico 1).

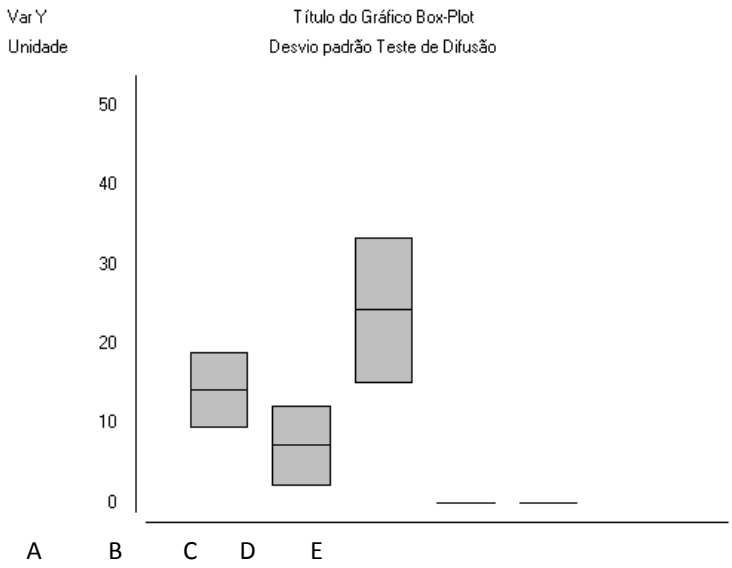


Gráfico 1–Desvio padrão referente às médias dos halos de inibição do teste de difusão,das soluções, sendo A- EHBB, B- Endoquil, C- clorexidina, D- DMSO e E a água

O eixo Y refere-se aos valores dos halos de inibição. Por este gráfico, vemos que os valores médios dos halos de inibição do barbatimão foram maiores do que os valores do Endoquil, e ambos não foram maiores do que os valores obtidos pela clorexidina. A água e o DMSO não apresentaram halos de inibição, sendo assim representados pelo traço horizontal.

O teste de difusão em ágar, ou também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e associa o tamanho da zona ou halo de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada[93]. As técnicas de difusão (por disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar ou poço) são testes qualitativos, assim optou-se por usar a técnica de microdiluição, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que consiste num teste quantitativo.

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano [81,82].

O método fornece os resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos testados. A sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação da amostra no caso de teste de materiais clínicos. Como controle, usa-se geralmente um quimioterápico padrão, que no nosso caso foi a clorexidina. Já como controle negativo, o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM & WASHINGTON II, 1991)[83.] A microdiluição é feita com microplacas de 96 pequenos poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL.

Os resultados obtidos no teste da CIM, estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos pela técnica microdiluição em caldo (CIM) frente aos microrganismos testados.

Microrganismo	Substância	MIC - µg/mL	*Controle positivo (chx)* µg/mL
Prevotella nigrescens ATCC 33563	Barbatimão	250	0,0922
	Endoquil	250	
Actinomyces naeslundii Cepa de campo odont. - 20	Barbatimão	> 2000	0,1844
	Endoquil	1000	
Actinomyces naeslundii ATCC 19039	Barbatimão	1500	0,0461
	Endoquil	≤ 100	
Porphyromonas gingivalis Cepa de campo - 100	Barbatimão	> 2000	0,0922
	Endoquil	1000	
Enterococcus faecalis ATCC 4082	Barbatimão	1000	0,3688
	Endoquil	> 2000	
Enterococcus faecalis Cepa de campo odont. - 25	Barbatimão	350	0,3688
	Endoquil	> 2000	
Haemophilus actinomycetemcomitans ATCC 43717	Barbatimão	1000	0,7375
	Endoquil	1000	
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*	Barbatimão	350	0,0461
	Endoquil	1000	

*esta cepa foi testada por último em virtude da dificuldade que observamos de crescimento em microplaca.

De acordo com os dados da tabela 5, verificamos que as substâncias testadas apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que o grupo controle positivo, representado pela clorexidina, foi o que teve os menores valores de CIM. O barbatimão e o Endoquil tiveram o mesmo valor de CIM frente a *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), de 250µg/mL, e o mesmo valor frente a *Haemophilus actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), de 1000µg/mL. O barbatimão mostrou uma CIM maior que a do Endoquil contra a espécie *Actinomyces naeslundii* (tanto para a cepa de campo quanto

para a ATCC), e também contra a espécie *Porphyromonas gingivalis* (cepa de campo). Já em relação às espécies *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Enterococcus faecalis* (Cepa de campo) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), o barbatimão mostrou concentrações inibitórias mínimas menores que as do Endoquil. Assim sendo, as substâncias foram eficientes frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (anaeróbias e anaeróbias facultativas).

Para elucidar melhor os dados da tabela 5, segue o gráfico 2, representando o desvio padrão dos resultados da amostra.

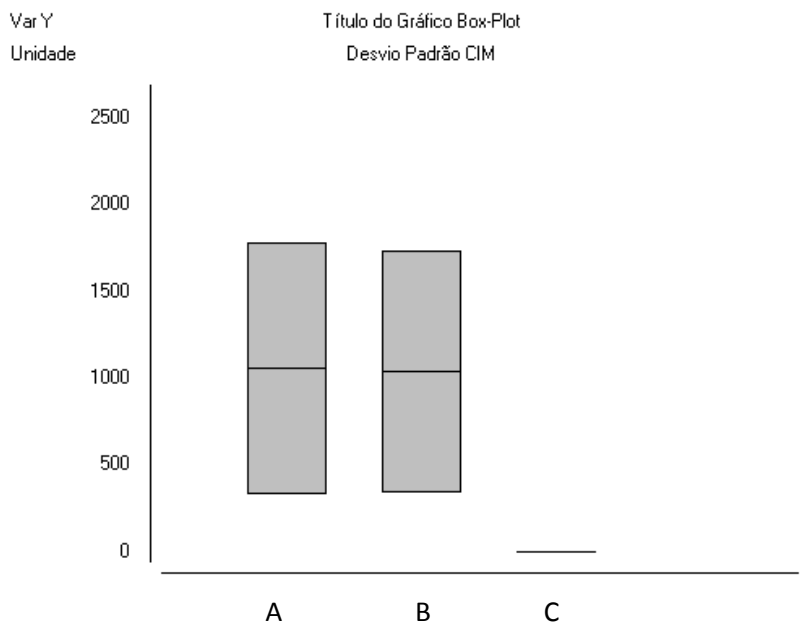


Gráfico 2 – Desvio padrão dos valores obtidos no teste de microdiluição (CIM) para as substâncias testadas, sendo A- barbatimão; B- Endoquil e C- clorexidina.

No gráfico 2, fica claro que para o teste da CIM os valores obtidos pelo barbatimão são muito semelhantes aos valores obtidos pelo Endoquil. Os valores obtidos pela clorexidina foram bem inferiores aos valores da amostra, o que comprova sua eficácia e eficiência frente aos microrganismos testados.O eixo Y, vertical, refere-se aos valores encontrados na determinação da CIM de cada substância.

Para o teste estatístico, foi usado o programa BioEstat, desenvolvido pelo Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM), organização social contratada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para cogerir as Reservas de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e Amanã (AM) em parceria com o governo do Estado do Amazonas. O programa está disponível na internet, e seu download é gratuito[84].

A seguir, apresentamos as tabela 6 e7, nas quais estão os dados estatísticos dos testes que foram realizados (ANOVA) para análise estatística dos dados do teste de difusão e do teste da concentração inibitória mímina (CIM).

Tabela 6 – Resultados da análise estatística para o teste de difusão, com base nas médias dos halos de inibição.

FONTES DE VARIAÇÃO	**GL**	**SQ**	**QM**
Tratamentos	4	34.1 e+02	853.645
Erro	35	896.792	25.623
F =	33.3160		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	14.2125		
Média (Coluna 2) =	7.2875		
Média (Coluna 3) =	24.3250		
Média (Coluna 4) =	0.0000		
Média (Coluna 5) =	0.0000		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	6.9250	3.8695	ns
Médias (1 a 3) =	10.1125	5.6506	< 0.01
Médias (1 a 4) =	14.2125	7.9415	< 0.01
Médias (1 a 5) =	14.2125	7.9415	< 0.01
Médias (2 a 3) =	17.0375	9.5200	< 0.01
Médias (2 a 4) =	7.2875	4.0720	< 0.05
Médias (2 a 5) =	7.2875	4.0720	< 0.05
Médias (3 a 4) =	24.3250	13.5921	< 0.01
Médias (3 a 5) =	24.3250	13.5921	< 0.01
Médias (4 a 5) =	0.0000	0.0000	ns

Tabela 7- Resultados da análise estatística dos dados obtidos pelo teste de microdiluição para determinação da CIM

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	58.8 e+05	29.4 e+05
Erro	21	69.9 e+05	33.3 e+04
F =	8.8303		
(p) =	0.0020		
Média (Coluna 1) =	1056.2500		
Média (Coluna 2) =	1043.7500		
Média (Coluna 3) =	0.2415		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	12.5000	0.0613	ns
Médias (1 a 3) =	1056.0085	5.1773	< 0.01
Médias (2 a 3) =	1043.5085	5.1160	< 0.01

Afim de tornar nossa análise mais didática, os resultados das tabelas 6 e 7 serão apresentados nos gráficos, 3 e 4.

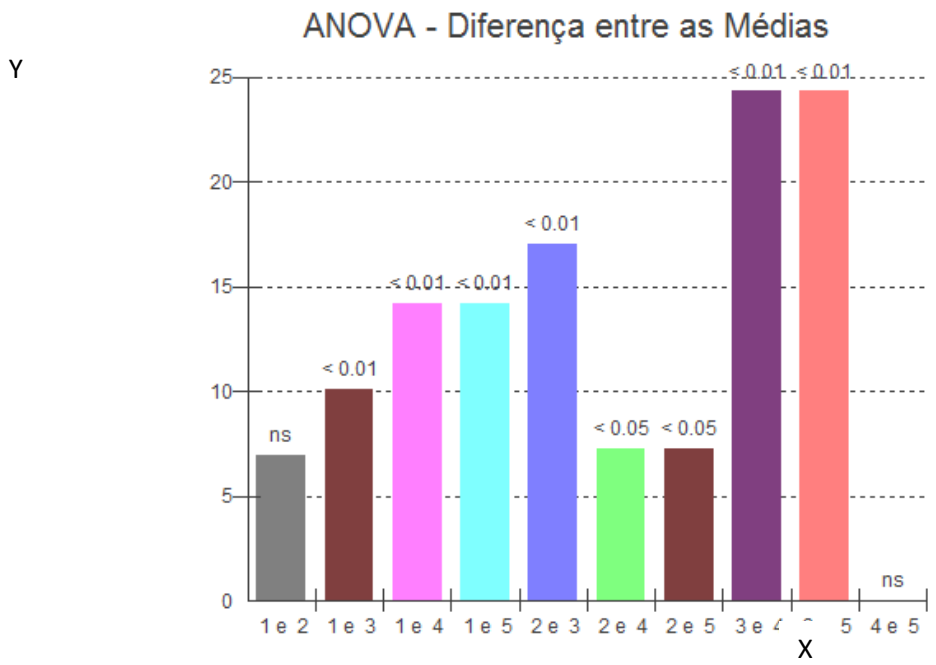


Gráfico 3- Representação dos dados estatísticos para o teste de difusão

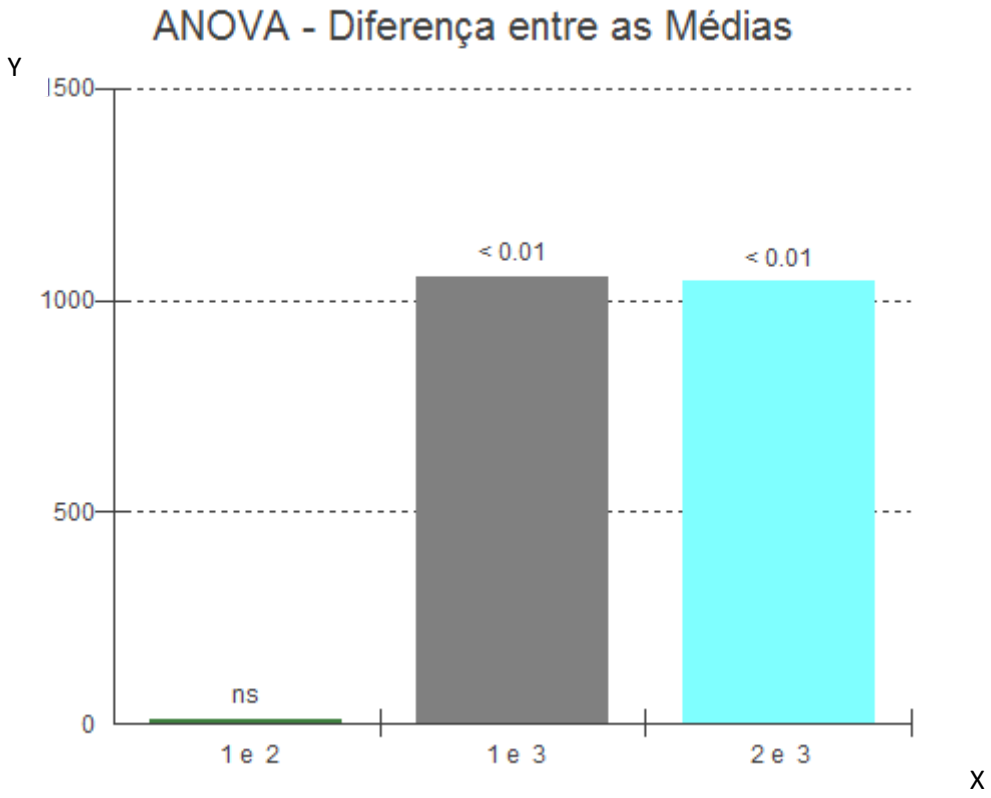


Gráfico 4 – Representação dos dados estatísticos da microdiluição (CIM)

De acordo com a análise estatística, ficou claro que no teste de difusão, um teste qualitativo, não houve diferença estatisticamente significante entre o barbatimão (valores da coluna 1 da tabela 6) e o Endoquil (valores da coluna 2 da tabela 6). Ao passo que houve diferença estatisticamente significante ($p<0,01$) entre os resultados do barbatimão em relação à clorexidina e do endoquil em relação à clorexidina (valores da coluna 3 da tabela 6). O gráfico 3 evidencia os resultados e ainda nos deixa claro que o DMSO e a água não apresentaram resultados estatisticamente significantes entre si (colunas 4 e 5 da tabela 6).

Com relação ao teste de microdiluição (CIM), a análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significante entre os resultados do barbatimão e do Endoquil (colunas 1 e 2 da tabela 7). O gráfico 4 mostra esse resultado, pelas diferenças entre as médias (1= barbatimão e 2= Endoquil), ao longo do eixo horizontal X, onde estão as substâncias com atividade antimicrobiana do teste (barbatimão, Endoquil e clorexidina).

Os resultados obtidos na determinação da CIM foram compatíveis com os encontrados na técnica do cilindro pelo método de difusão em ágar, demonstrando que o EHBB tem um potencial antimicrobiano interessante. Entretanto, não existe uma correlação direta entre o tamanho do halo de inibição e uma maior ou menor atividade do extrato testado. Se fosse assim, os gráficos 1 e 2 (desvio padrão) e 3 e 4 (ANOVA) teriam representações semelhantes, o que não foi demonstrado. Tal fato já foi observado em outros estudos, que também testaram a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, e correlaciona os maiores halos com uma maior atividade (ALVES et al. 2000; RAUHA et al., 2000; AHMAD et al., 2001; ANDRADE et al., 2005; ORLANDO, 2005)[85,86,87,88,73].

A falta de correlação entre halo de inibição e a CIM relaciona-se com a velocidade de difusão da substância que foi testada. Aquelas substâncias de peso molecular mais baixo difundem-se mais rapidamente do que as substâncias de maior peso molecular, produzindo halos de inibição maiores do que substâncias de alto peso molecular. Dessa forma, mesmo que uma substância tenha uma excelente ação antimicrobiana, se ela possuir um alto peso molecular, possivelmente terá um halo de inibição pequeno devido à velocidade de difusão (BLACK, 2002)[89].

Ainda nesse contexto, ELOFF (1988) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, entre eles o fato de que as células de alguns microrganismos acabaram aderindo-se à base do poço, enquanto as de outros permaneceram em suspensão[90]. Outro fato bastante interessante foi o fato de que os compostos presentes em alguns extratos precipitavam, além do fato de a coloração verde da clorofila ter interferido na análise final. Apesar destes inconvenientes, o método de microplacas (CIM) é um método barato, cuja reprodutibilidade facilita vários testes ao mesmo tempo, é bastante sensível, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente [81,82,90].

Existem relatos da atividade antibacteriana do *S. adstringens* (que pertence à família *Leguminosae*) contra as espécies *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*[85,91]. Neste trabalho, optou-se por bactérias que tenham papel importante no desenvolvimento de doenças endodônticas (e periodontais).

No interior do sistema de canais radiculares, a composição da microbiota está vinculada a fatores e forças ecológicas, entre as quais se destacam os nutrientes, a quantidade de oxigênio disponível e as interações entre os microrganismos. O que muitos autores chamam de virulência, na verdade está muito relacionado à essa luta das bactérias em adaptar-se e sobreviver nas condições em que se encontram nos canais radiculares.

A questão do oxigênio disponível é fundamental para se entender os casos de infecção necrótica dos canais radiculares. Além desse fato, as bactérias ditas facultativas consomem o oxigênio que resta no interior desses canais tornando o ambiente ainda mais anaeróbio. Com o passar do tempo, a microbiota presente sofre alterações na sua composição, tornando-se tipicamente anaeróbia, dominada por espécies proteolíticas[92].

Analisando a microbiota presente nas infecções endodônticas com aquela presente nas infecções periodontais, vemos que muitas espécies encontradas na chamada periodontite apical estão presentes nas bolsas periodontais, com algumas exceções. O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é encontrado quase exclusivamente nas infecções periodontais e o *Porphyromonas endodontalis* nas infecções tipicamente endodônticas (VAN WINKELHOFF et al.,1985; HAAPASALO et al., 1986a; VAN WINKELHOFF et al., 1988)[93,94,95].

Interessante notar que o *Porphyrmonas gingivalis* apareceu tanto nas infecções endodônticas como nas periodontais. SUNDQVIST et al., em 1991, verificaram diferenças entre amostras de *Porphyrmonas gingivalis*, bactérias muito ligadas às lesões avançadas de doença periodontal e que possuem atividade proteolítica, que afetam a defesa do hospedeiro. Os fatores C3 e C5 do sistema complemento, assim como imunoglobulinas, são degradados, indicando o poder de interferência no sistema de defesa imunológico. Verificaram amostras de *P. gingivalis* que foram fagocitadas e outras resistentes à fagocitose, mas esse fato não teve relação direta com a virulência das bactérias, quando foram injetadas subcutaneamente nos animais da pesquisa[96].

É sugerido que existe uma relação entre os sintomas típicos da infecção endodôntica, como a dor, edema, abscessos, estejam associados à presença dos chamados *Bacteroides* negro-pigmentados, ou como atualmente são considerados, bastonetes anaeróbios Gram-negativos negro-pigmentados. Espécies de *Porphyromonas* (negro-pigmentado), *Prevotella*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas*

endodontalis estavam presentes em pacientes sintomáticos, enquanto que espécies de *Prevotella* (*P. intermedia, P. denticola e P. loescheei*) estavam presentes nos pacientes sintomáticos e assintomáticos[94]. Além desse fato, a identificação do *Porphyromonas* negro-pigmentado, assim como a identificação das espécies de *Prevotella* no começo do tratamento endodôntico também foi associada à presença de sintomas ainda na segunda consulta da terapia. Importante dizer que a tendência é de os sintomas desaparecerem após o início da terapia endodôntica.

Segundo GOMES, et al., 2004, sintomas de infecção aguda, tais como dor, dor à percussão, edema, foram associados à espécies Gram-negativas, especialmente *Prevotella*, *Porphyromonas* spp. e fusobactérias, de acordo com o que foi encontrado por outros autores. As bactérias Gram-negativas contêm endotoxinas, que podem levar à produção de bradicinina, um potente mediador da dor. Relataram que dentes com falhas no tratamento endodôntico estão associados aos microrganismos facultativos, como o *Enterococcus* e o *Streptococcus*, em concordância com os achados de MOLANDER et al.,1998; SUNDQVIST et al.,1998 e PINHEIRO et al.2003. No estudo em questão, os autores também encontraram falhas no tratamento endodôntico associadas à bactérias anaeróbias estritas, incluindo *P. micros* e *F. necrophorum*[97].

Hoje em dia, vários métodos têm sido usados na identificação de outros patógenos endodônticos, sendo que outras técnicas poderão ser utilizadas no futuro. Quanto mais sensível o método, maior a chance de detectar microrganismos que inicialmente não eram identificados. Entre os métodos mais recentes, destacamos o método de hibridização DNA-DNA, que através de sondas de DNA permite a determinação simultânea de várias espécies bacterianas em amostras clínicas múltiplas ou unitárias, muito útil para pesquisas de cunho epidemiológico em grande escala. Entretanto, esse método pode fornecer falso-negativos e falso-positivos e, além disso, algumas espécies não esperadas, ainda podem permanecer não-detectadas[98].

Outro método bastante sensível é o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), que envolve a replicação de DNA *in vitro*. Esse método pode detectar de 1 a 10 células bacterianas numa amostra, o que faz dele um método de 10 a 100 vezes mais sensível do que qualquer outro método de identificação.O PCR pode ter uma especificidade única, pois cada espécie microbiana possui uma seqüência particular de DNA.

Usando o método de hibridização DNA-DNA e o PCR, SIQUEIRA, et al. (2002) verificaram que o *Actinomyces* ssp estava presente em 9,4% das amostras, enquanto que o *Streptococcus* ssp estavam presentes em 22,6% e o *E. faecalis* em 7,5% das amostras desse estudo. As bactérias Gram-negativas têm sido usualmente associadas com o desenvolvimento de sinais e sintomas das endodontopatias, mas estudos têm mostrado que algumas espécies Gram-positivas, como o *E.faecalis* e o *Actinomyces* spp tem sido encontrados mais frequentemente nas infecções persistentes, inclusive nos casos de falhas e insucessos. Os autores insistem que isso não pode ser considerado uma regra, e no estudo em questão, eles verificaram que as espécies *S. constellatus* e *Actinomyces* spp, microrganismos Gram-positivos, estiveram associados com sintomas de doença perirradicular[99].

GOMES et al. em 2005 identificou, através do método PCR, quatro bactérias negro-pigmentadas presentes em dentes com polpa necrótica. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* foram identificadas com maior freqüência em dentes com polpa necrosada (não tratados, ou com infecção primária) do que em dentes tratados endodonticamente, com falhas ou insucessos (infecção secundária), apesar do fato de infecções primárias apresentaram sintomas característicos. Nas infecções secundárias, essas bactérias negro-pigmentadas foram identificadas em dentes tidos como sintomáticos ou assintomáticos. O PCR apresentou melhores resultados na identificação de bactérias do que pela técnica de cultura clássica[100].

GOMES et al, 2006 verificou, através do método PCR, que o *E. faecalis* que raramente é encontrado nas infecções primárias, nos dentes com polpa necrosada, foi encontrado em 82% das amostras. Já em relação à presença do *E. faecalis* nos dentes já tratados endodonticamente (infecções secundárias), essa espécie foi encontrada em 76% das amostras. Isso evidencia que esse microrganismo está presente em várias fases das doenças endodônticas, e além do mais, quando está presente em infecções secundárias, significa que conseguiu sobreviver ao preparo químico-mecânico e aos medicamentos usados entre as sessões de tratamento endodôntico[101].

Vemos dessa forma, a importância do uso de substâncias com atividade antimicrobiana no tratamento endodôntico. No nosso estudo, verificamos que as substâncias testadas apresentaram atividade contra o *E. faecalis* e também contra

bactérias Gram-negativas, o que nos leva a crer que essas substâncias são promissoras no intuito de debelar os microrganismos presentes nas infecções endodônticas, notadamente quando houver polpa necrosada.

A importância de substâncias como o Endoquil e o extrato de barbatimão refere-se à possibilidade de tratamentos efetivos com baixos riscos à saúde dos pacientes que estão em tratamento endodôntico. Recentes trabalhos mostram que o barbatimão pode ser útil em várias áreas, inclusive no tratamento de crescimento excessivo de pêlos, como demonstrado no trabalho de VICENTE et al.(2009). Neste estudo, ficou clara a ação benéfica do creme contendo extrato de *Stryphnodendron adstringens*, e segundo os dados obtidos, houve até uma melhora dos quadros de hiperpigmentação, foliculite e acne[102].

A identificação e emprego das substâncias ativas do barbatimão, podem ser úteis na pesquisa de novos irrigantes ou novas medicações de uso na Endodontia. No sentido de pesquisar os compostos fenólicos, que variam no barbatimão, assim como em outras espécies, em função de variações sazonais, composição do solo, solvente usado na extração das frações e partes da planta utilizadas, MARINO et al., em 2009, usaram o ácido tânico como composto padrão para expressar o total de polifenóis contido nos extratos aquosos de várias plantas (incluindo o barbatimão) e verificaram tratar-se de um método rápido e confiável na caracterização de plantas ricas em polifenóis[103].

O ácido tânico, já foi usado em trabalhos na Endodontia, como verificamos através dos trabalhos de BITTER (1989,1990)[56,57], o que nos mostra que existem muitas possibilidades de uso do extrato do barbatimão e suas frações (em diversos solventes).

Novas pesquisas poderão dizer se o barbatimão pode ou não ser utilizado como auxiliar da terapia endodôntica. Nosso estudo deixa claro que este material, assim como o detergente derivado da mamona, tem incríveis propriedades, que se bem aplicadas podem dar origem a produtos e patentes na área odontológica.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível chegar às seguintes conclusões:

1 – As soluções de extrato hidroalcoólico bruto do ***Stryphnodendron adstringens*** (Mart) Coville (barbatimão), detergente derivado da mamona (Endoquil®) e da clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana.

2 – Em todos os testes microbiológicos empregados e para todos os microrganismos, a clorexidina apresentou os melhores resultados.

3- No teste de difusão em ágar, pela técnica do cilindro, os melhores resultados obtidos foram com a clorexidina, seguidos do barbatimão e do Endoquil® respectivamente.

4 - Os resultados do teste de microdiluição (CIM) mostraram que entre o barbatimão e o Endoquil® não houve diferenças estatisticamente significantes.

5 - Não houve correlação direta entre os dados dos dois testes usados.

6- O microrganismo *Prevotella nigrescens (ATCC 33563)* foi o mais sensível frente às drogas usadas no teste de difusão.

7 - O barbatimão e o Endoquil® tiveram o mesmo valor de CIM frente a *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563) e o mesmo valor frente a *Haemophilus actinomycetemcomitans* (ATCC 43717).

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. MILLER WD. An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp. Dental Cosmos. 1894; 36: 505-8.

2. KAKEHASHI S, STANLEY H, FITZGERALD R. The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg. 1965; 20: 340-349.

3. JUNG YI, CHOI BK, KUM KY, ROH BD, LEE SJ, LEE CY, PARK DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. J Endod.2000; 26: 599-604.

4. SUNDQVIST G. Association between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiology and Immunology. 19927: 257-62.

5. GOMES BPFA, LILLEY JD, DRUCKER DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. Int Endod J. 1996; 29: 235-41.

6. SUNDQVIST G, JOHANSSON E, SJOGREN U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J Endod.1989; 15: 13-18.

7. CHAILERTVANITKUL P, SAUNDERS WP, SAUNDER EM, MACKENZIE D.An evaluation of microbial coronal leakage in the restored pulp chamber root-canaltreated multirooted teeth. Int Endod J.1997; 30: 318-21.

8. DWAN JJ, CLICKMAN GN. 2-D photoelastic stress analysis of NiTi and stainless steel finger spreaders during lateral condensation. J Endod.1995; 21:224.

9. GOLDMAN LB, GOLDMAN M, KRONMAN JH, Lin PS. The efficacy o several irrigating solutions for endodontics: a scanning electon microscopy study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol.1981; 52:197-200.

10. HÜLSMANN M, HECKENDORFF M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. Int Endod J.2003; 36: 810-3.

11. BARBIN, EL.Estudo *in vitro* do efeito da adição de lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino.[Dissertação].Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 1999.

12. MACHADO MEL. Requisitos das substâncias químicas auxiliares, In:MACHADO MEL. Endodontia: da biologia à técnica. São Paulo, Ed Santos; 2007,p.255.

13. BAUMGARTNER JC, CUENIN, PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod. 1992;18: 605-12.

14. SCHMITT, PF. Avaliação comparativa do poder de desinfecção da soda clorada versus líquido de Dakin associado ao endo-ptc, de canais radiculares cotaminados *in vitro* por *Enterococcus faecalis*. [Dissertação]. Campinas: Centro de Pós-Graduação/CPO São Leopoldo Mandic; 2005.

15. AUN CE, PAIVA JG. Viabilidade da velocidade de ação germicida do hipoclorito de sódio em função da concentração (Contribuição ao estudo). Rev Ass Paul Cir Dent. 1982;36 (5): 510-7.

16. REEH ES, Messer HH. Long-term paresthesia following inadvertent forcing of sodium hypochlorite through perforation in maxillary incisor. Endod Dent Tramat. 1989;5 (4): 200-3.

17. INGRAM TA. Response o the human eye to accidental exposure to sodium hypochlorite. J Endod. 1990;16 (5), 235-8.

18. PASHLEY EL, BIRDSONG NL, BOWMAN K, PASHLEY DH. Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. J Endod. 1985; 11:525-8.

19. BUSSLINGER A, SENER B & BARBAKOW F. Effects of sodium hypochlorite on niquel-titanium Lightspeed® instruments. Int Endod J. 1998; 31: 290-4.

20. KAUFMAN AY & KEILA S.Hypersensivity to sodium hypochlorite. J Endod. 1989; 15: 224-6.

21. ROLLA G, MELSEN B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res. 1975; 54: 57-62.

22. HELGELAND K, HEYDEN G ROLLA G. Effect of chlorhexidine on animals cells *in vitro*. Scand J Dent Res. 1971; 79: 209-15.

23. CHEUNG GS, STOCK CJ. *In vitro* cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. Int Endod J. 1993; 26: 334-7.

24. EVANOV C, LIEWER FR, BUXTON TB, JOYCE AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine irrigants at 37°C and 46°C. J Endod. 2004; 30: 653-7.

25. HELING I, CHANDLER NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. Int Endod J. 1998; 31: 8-10.

26. RINGEL AM, PATTERSON SS, NEWTON CW, MILLER CH & MULHERN JM. *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. J Endod. 1982; 11:525-8.

27. JEANSONNE MJ & WHITE RR. A comparison of 2,0% chlorhexidine gluconate and 525% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod. 1994;20: 276-8.

28. GOMES BPFA, FERRAZ CCR, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB & SOUZA-FILHO FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2001; 34: 424-8.

29. KURUVILLA JR & KAMATH MP.Antimicrobial activity of 2,5% sodium hypochlorite and 0,2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J Endod. 1998;24: 472-76.

30. LEONARDO MR, TANOMARU FILHO M, SILVA LAB; NELSON FILHO P, BONIFÁCIO KC & ITO IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod.1999; 25: 187-96.

31. RIBEIRO AQ, LEITE JPV, DANTAS-BARROS, AM. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. Rev Bras Farmacogn. São Paulo, 2005; 15: 65-70.

32. CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory gudelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). Braz J Med Bio Res. Ribeirão Preto, 2000; 33: 179-189.

33. LAPA AJ SOUCCAR C, LANDMAN MTRL, GODINHO RO, LIMA TCM. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES CMO, SHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª ed. Porto Alegre: Ed. Universidade, 2000; p 181-196.

34. RODRIGUES, VGS. Cultivo e utilização de ervas medicinais (Embrapa). Disponível em: http:// www. cpafro.embrapa.br/Embrapa/infotec/plantamed.

35. NODARI RO, GUERRA MP. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES CMO, SHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª ed. Porto Alegre: Ed. Universidade, 2000; p 11-24.

36. CHIERICE GO, Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP). Disponível em: http://www.poliquil.com.br

37. IGNÁCIO H. Utilização do cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento da falha óssea: estudo experimental em coelhos. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 96p, 1995.

38. ARAÚJO CA, TEÓFILO JM, BRENTEGANI LG. Cronologia de reparo alveolar do rato após implante de *Ricinus communis*. In: XIII Reunião Anual da SBPQO, 1996. Anais.p120.

39. SUGUIMOTO RM. Implante de polímero de mamona (*Ricinus communis*) sobre o mento. Estudo histológico em macacos. [Dissertação].Araraquara: Faculdade de Odontologia (Campus de Araçatuba), Universidade Estadual Paulista, 1997. 102p.

40. LAMANO CARVALHO TL. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. Int J Oral Max Surg.1997; 26:149-52.

41. FERREIRA CM. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas em Endodontia sobre as bactérias anaeróbias. [Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1999. 119p.

42. FERREIRA CM et al. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigants solutions in teeth with pulpar necrosis. Braz Dent J. 1999;10: 15-21.

43. GARCIA JR IR. Utilização dos implantes de polímero- Medpor, poliuretana de mamona e matriz óssea bovina em defeitos ósseos maxilares. Análise histológica e histométrica em macacos.[Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.2000.85p.

44. LEONARDO MR. et al. In vivo evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil –based irrigant. J Endod. 2001; 27: 717-9.

45. TEIXEIRA FB. Remoção de smear layer dos canais radiculares utilizando o irrigante Endoquil. RBO. 2001; 58: 424-6.

46. YAMASHITA, et al. Avaliação de superfícies biomecanizadas utilizando diferentes soluções irrigadoras. In: V Jornada Odontológica: Madre Mary Clare Millea. Universidade do Sagrado Coração, 2004. Anais.

47. FREITAS LEONEL EC, PORCIÚNCULA HF, ANDRADE SOBRINHO J, RAMALHO LTO, MANGILI PD, RAPOPORT A. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Acta Cir Bras [serial online]. 2004; 19:342-50.

48. SIQUEIRA DCR. Avaliação comparativa in vivo da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1% da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10%, utilizados como soluções irrigadoras em Endodontia.[Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2005, 110p.

49. DONTOS A C. Fio lifting biológico: fio serrilhado de poluretana do óleo de mamona: avaliação de sua biocompatibilidade e eficácia no rejuvenescimento facial. [Dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2005, 75p.

50. KAHIL C A, CUNHA GA, MACEDO MN, ORLANDO TC, CARLIK, J. Avaliação de algumas propriedades físico-químicas de uma substância irrigadora de canais radiculares (Endoquil®) / Evaluation of some physico-chemical properties of a root canals irrigator substance (Endoquil®). Rev. Paul. Odontol;31(2):5-7, abr.-jun. 2009.

51. CAMARGO, MTLA. Medicina popular. São Paulo: Almed, 1985.

52. INDEX KEWENSIS. *Stryphnodendron adstringens*. In: Index Kewensis, Oxford: Clarendon, 1885: 2, p1010.

53. CORRÊA MP. Dicionário das plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1984; 3: 267-69.

54. LORENZI H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. 3ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000;1, 188p.

55. VASCONCELOS MC, RODOVALHO NCM, POTT VJ, FERREIRA AMT, ARRUDA ALA, MARQUES MCS, CASTILHO RO, BUENO NR. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). Rev Bras Farmacogn. 2004; 14: 121-127.

56. BITTER NC. A 25% tannic acid solution as a root irrigant cleanser: a scanning electron microscope study.Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1989; 67: 333-37.

57. BITTER NC. The effect of 25% tannic acid on prepared dentin: A scanning electron microscope-methylene blue dye study. J Prost Dent. 1990; 64: 12-16.

58. LIMA JCS, MARTINS DTO, SOUZA JR PT. Experimental evaluation of Stem Bark of Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville for antiinflamatory activity. Phyto Res. 1998; 12: 218-220.

59. AUDI EA, TOLEDO DP, PERES PG, KIMURA E, PEREIRA WKV, DE MELLO JCP, NAKAMURA C, ALVES-DO-PRADO W, CUMAN RKN, BERSANI-AMADO CA. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. Phyto Res. 1999; 13: 264-266.

60. REIS CMF, CARVALHO JCT, CAPUTO LRG, PATRÍCIO KCM, BARBOSA MVJ, CHIEFF AL, BASTOS JK. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e

toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. Rev Bras Farmacogn. 2000; 9: 43-52.

61. RATES SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. Rev Bras Farmacogn. 2001; 11: 57-69.

62. PAIXÃO CCB, SANTOS AA, OLIVEIRA CCC, SILVA LG, NUNES MAR. Medicinal plants in oral diseases.Odontologia Clín Cientif, Recife. 2002; 86p.

63. COSTA TEM, DIAS APM, CAPRILES PVSZ, OLIVEIRA MBN, AMORIN ELC, LIMA CSA, BERNARDO-FILHO M. Effect of barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville] infusion on the labling of blood elements with technetium-99m. Rev Bras Farmacogn. 2002; 12: 7-9.

64. HERZOG-SOARES JD, ALVES RK, ISAC E, BEZERRA JCB, GOMES MH, SANTOS SC, FERRI PH. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). Rev Bras Farmacogn. 2002; 12: 01-02.

65. PANSERA MR, SANTOS ACA, PAESE K, WASUM R, ROSSATO M, ROTA LD, PAULETTI GF, SERAFINI LA. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. Ver Bras Farmacogn. 2003; 13: 17-22.

66. MARTINS OS, ALVES ALG, HUSSNI CA, SEQUEIRA JL, NICOLETTI JLM, THOMASSIAN A. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. Arch Vet Sci. 2003; 8: 1-7.

67. SANCHES ACC, LOPES GC, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP, DE MELLO JCP. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth.Rev Bras Cien Farm. 2005; 41: 101-7.

68. HOLETZ FB, NAKAMURA TU, DIAS FILHO BP, DE MELLO JCP, DIAZ JAM, TOLEDO CEM, NAKAMURA CV. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2005; 100: 397-401.

69. FELIPE AMM, RINCÃO VP, BENATI FJ, LINHARES REC, GALINA KJ, TOLEDO CEM, LOPES GC, DE MELLO JCP, NOZAWA C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifollia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. Biol Pharm Bull. 2006; 29: 1092-1095.

70. ISHIDA K, DE MELLO JCP, CORTEZ DAG, DIAS FILHO BP, NAKAMURA TU, NAKAMURA CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. J Antimic Chem. 2006; 58: 942-949.

71. ISHIDA K, ROZENTAL S, DE MELLO JCP, NAKAMURA CV. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. Ann Clin Microb Antimicrob 2009; 8: 29.

72. MELO E SILVA F, DE PAULA JE, ESPINDOLA LS. Evaluation of the antifungal potential or brazilian cerrado medicinal plants. Mycoses. 2009; 52: 511-517.

73.ORLANDO SC. Avaliação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Barbatimão). [Dissertação]. Franca: Universidade de Franca. 2005. 89p.

74. SCHAEDLER R W, DUBOS R & CASTELLO R.1965, j. Exp. Med., 122:59. Disponível em: http://www.biosystems.com.br/arquivos/produtos/1055.pdf.

75. MACHADO MEL. Microbiologia das infecções endodônticas, In:MACHADO MEL. Endodontia: da biologia à técnica. São Paulo, Ed Santos; 2007, p40-41.

76. GROVE DC, RANDALL WA. Assay methods of antiobiotics: a laboratory manual (Antibiotics Monographs).New York: Medical Encyclopedia. 1955.

77. ANDREWS JM. The journal of antimicrobial. Chemoth, London. 2001; 48:5-16.

78. PALOMINO JC, MARTIN M, CAMACH M, GUERRA H,SWINGS J, PORTALES F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method of detection of drug resistence in *Micobacterium tuberculosis*. Antim Ag Chem. 2002; 46: 2720-2722.

79. COWAN MM. Plants products as antimicrobial agents. Clin Microb Rew. 1999; 12: 564-582.

80. ARDISSON L, GODOY JS, FERREIRA LAM, STEHMANN JR, BRANDÃO MGL. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens*(Mart.)Coville (Barbatimão). Ver Bras Farmacog. 2002; 12: 27-34.

81. PINTO TJA, KANEKO TM, OHARA MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2003. 2ªed. São Paulo: Atheneu Editora, 325p.

82. OSTROSKY EA, MIZUMOTO MK, LIMA MEL, KANEKO TM, NISHIKAWA SO, FREITAS BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacog. 2008; 18: 301-307.

83. SAHM DF, WASHINGTON II JA. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALLOWS A, HAUSER WJ, HERMANN KL, ISENBERG HD, SHAMODY HJ. Manual of clinical microbiology.1991. 5ª ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.1105-1116.

84. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. Disponível em: http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%205%20Portugues&order=0

85. ALVES TMA. Biological screening of brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz.. Rio de Janeiro. 2000; 95: 367-373.

86. RAUHA JP, REMES S, HEINONEN M, HOPIA A, KAHKONEN, KUJAL T, PIHLAJA K, VUORELA H, VUORELA P. Antimicrobial effects of finnish plant extrats containing flavonoids and other phenolic compounds. Int J Food Microb. 2000;56: 3-12.

87. AHMAD I, BEG AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi resistant human pathogens. J Ethnopharm. Limerick. 2001; 74: 113-123.

88. ANDRADE CA, PEITZ C, CÚNICO M, CARVALHO JLS, ABRAHÃO WM, MIGUEL OG, MIGUEL MD, KERBER VA. Avaliação da atividade antibacteriana e

triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyrifolia* A. Cunn.Ex.G. Don Leguminosae- Mimosoidae. Rev Bras Farmacog. 2005; 15: 13-15.

89. BLACK JG. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002; cap 13 p.316-347.

90. ELOFF JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. Planta Med. 1998; 64: 711-713.

91.TOLEDO CEM. Estudos anatômicos, químicos e bilógicos de casca e extratos obtidos de Barbatimão [Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville, Legumiosae. [Dissertação]. Araraquara: Universidade Paulista (UNESP).2002,

92.FABRICIUS L, DAHLEN G, OHMAN AE, MOLLER AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982; 90: 134-137.

93.VAN WINKELHOFF AJ, CARLEE AW, DEGRAAFF J. Bacteroides endodontalis and other black-pigmented Bacteroides species in odontogenic abscesses. Infect Immun. 1985; 49:494-497.

94. HAAPASALO M, RANTA H, RANTA K, SHAH H. Black pigmented bacteroids spp in human apical periodontitis. Infect Immun. 1986a; 53: 149-153.

95. VAN WINKELHOFF AJ, VAN STEENBERGEN TJM, DE GRAFF J. The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. J Clin Period. 1988; 15: 145-155.

96. SUNDQVIST G, FIGDOR D, HANSTRON L, SORLIN S, SANDSTROM G. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. Scand J Dent Res. 1991; 99: 117-129.

97.GOMES BPFA, PINHEIRO ET, GADE-NETO CR, SOUSA ELR, FERRAZ CCR, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19:71-76.

98. SOCRANSKY SS, SMITH C, MARTIN L, PASTER BJ, DEWHIRST FE, LEVIN AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. Biotech.1994; 17:788-92.

99. SIQUEIRA JF, ROÇAS I N, SOUTO R, UZEDA M, COLOMBO AP. *Actinomyces species*, Streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. J Endod. 2002; 28:168-172.

100. GOMES BPFA, JACINTO RC, PINHEIRO ET, SOUZA ELR, ZAIA AA, FERRAZ CCR, SOUZA-FILHO FJ. *Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermédia* and *Prevotella nigrescens*.Oral Microbiol Immunol. 2005;20: 211-215.

101. GOMES BPFA, PINHEIRO ET, SOUSA ELR, JACINTO RC, ZAIA AA, FERRAZ CCR, SOUZA-FILHO FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod. 2006; 102: 247-253.

102. VICENTE RA, LEITE E SILVA VR, BABY AR, VELASCO MVR, BEDIN V. Double-blind, randomized, placebo- controled Trial of a cream containing the *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville bark extract for suppressing terminal hair growth. Eur Acad Derm Ven. 2009; 23: 410-414.

103. MARINO DC, SABINO LZL, ARMANDO JR J, RUGGIERO AA, MOYA HD. Analysis of the polyphenols content in medicinal plants based on the reduction of Cu (II)/ Bicinchoninic complexes. J Agric Food Chem. 2009; 57: 11061-11066.

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