



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA CLÍNICA

AMARO LAFAYETTE NOBRE FORMIGA FILHO

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DE PASTAS INTRACANAL
COMERCIALIZADAS E FORMULADAS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS
DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

CAMPINA GRANDE - PB

2012

AMARO LAFAYETTE NOBRE FORMIGA FILHO

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DE PASTAS INTRACANAL
COMERCIALIZADAS E FORMULADAS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS
DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia, nível Mestrado, área de Clínica Odontológica, da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Ana Cláudia Dantas de Medeiros

CAMPINA GRANDE - PB

2012

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

F723e Formiga Filho, Amaro Lafayette Nobre.
Estudo comparativo da eficácia in vitro de pastas intracanal comercializadas e formuladas a partir de plantas medicinais do semiárido brasileiro [manuscrito] / Amaro Lafayette Nobre Formiga Filho. – 2012.
63 f. : il. color.

Digitado
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia”.

1. Endodontia. 2. Fitoterapia. 3. *Enterococcus faecalis*.
I. Título.

21. ed. CDD 617.634 2

**ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DE PASTAS INTRACANAL
COMERCIALIZADAS E FORMULADAS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS
DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia, nível Mestrado, área de Clínica Odontológica, da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de mestre.

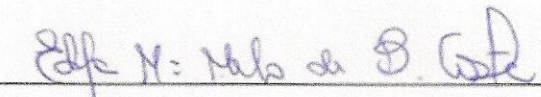
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Orientadora (DF/CCBS/UEPB)



Profª Drª Fábio Roberto Dametto
Examinador Externo (UNP/UFRN)



Profª Drª Edja Maria Melo de Brito Costa
Examinadora Interna (DO/CCBS/UEPB)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pela demonstração
de amor, amizade, paciência e dedicação.
A estes que não medem esforços para que
minhas escolhas sejam bem sucedidas,
agradeço por tudo, obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Dantas de Medeiros pela orientação, dedicação, paciência e apoio durante toda a pesquisa e pelos ensinamentos que serão úteis por toda a vida.

À minha família, em especial a meus pais e irmãos, pelo incentivo e força, colaborando com minha formação moral e acadêmica de diversas formas.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (Labdem), do Laboratório de Química Analítica e Quimiometria (LQAQ) e do Laboratório de Certificação de Biomateriais (CertBio) que me ensinaram e ajudaram no desenvolvimento da pesquisa, compartilhando momentos de sufoco e de alegrias.

Aos meus amigos e colegas do mestrado por toda a consideração, amizade, incentivo e companheirismo demonstrados durante todo o curso.

À todos os professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia por compartilhar os seus conhecimentos e pela sua dedicação ao programa de mestrado.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia e a todos os funcionários envolvidos nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior, ao seu aluno Renato Felipe e à Universidade Federal de Alagoas por permitirem o uso de seus equipamentos para a nebulização dos extratos.

À Universidade Estadual da Paraíba e a CAPES, responsáveis pela existência deste mestrado.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* medicações experimentais formuladas a partir de plantas do semiárido brasileiro, *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Ximenia americana* L., comparando sua eficácia com medicações comerciais. Foram preparados inicialmente extratos hidroalcoólicos de seis plantas medicinais (*Schinopsis brasiliensis* Engl., *Ximenia americana* L., *Cereus jamacaru* DC., *Croton campestris* ST. Hill, *Spondias mombin*, *Zornia reticulata* SM.), os quais foram submetidos a um *screening* microbiológico frente à *Enterococcus faecalis* pelo método de diluição em ágar, técnica do cilindro. Os dois extratos de maior eficácia, *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Ximenia americana* L., foram nebulizados e sua potência foi avaliada através do mesmo método. Em seguida foi realizada a contaminação *in vitro* dos elementos dentários com *E. faecalis* por 60 dias, com o crescimento bacteriano comprovado através da Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Óptica e de testes microbiológicos. Decorrido o período de inoculação, os elementos dentários foram irrigados, secos e preenchidos com diferentes medicamentos: 1 – pasta experimental de *S. brasiliensis*, 2 – pasta experimental de *X. americana*, 3 – pasta comercial Calen[®] e 4 – pasta CTZ. A remoção das pastas e a leitura dos resultados foram realizadas após 8 e 28 dias da sua aplicação. Os resultados obtidos mostraram que a pasta formulada a base da *X. americana* apresentou maior eficácia e foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis* após 28 dias de tratamento, quando comparado com as outras pastas testadas, com exceção da CTZ que apresentou os melhores resultados durante todo o período de tratamento.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*; Endodontia; Fitoterapia; Produtos com Ação Antimicrobiana; Hidróxido de Cálcio.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* experimental drugs made from plants of the Brazilian semiarid region, *Schinopsis brasiliensis* Engl. and *Ximenia americana* L., comparing its effectiveness with commercial medications. Hydroalcoholic extracts were prepared from six medicinal plants (*Schinopsis brasiliensis* Engl., *Ximenia americana* L., *Cereus jamacaru* DC., *Croton campestris* ST. Hill, *Spondias mombin*, *Zornia reticulata* SM.), which were subjected to an *Enterococcus faecalis* microbiological screening by agar dilution method, cylinder technique. The two groups of greater efficiency, *Schinopsis brasiliensis* Engl. and *Ximenia americana* L., were nebulized and potency was evaluated by the same method. *In vitro* contamination with *E. faecalis* was performed in teeth for 60 days with bacterial growth evaluated by scanning electron microscopy, optical microscopy and microbiological tests. After the inoculation period, the teeth were irrigated, dried and filled with different drugs: 1 - experimental *S. brasiliensis* paste, 2 - experimental *X. americana* paste, 3 - Calen ® paste and 4 – CTZ paste. The pastes removal and analysis of the results were performed after 8 and 28 days after their application. The results showed that the *X. americana* paste had greater efficacy and was able to inhibit the growth of *E. faecalis* after 28 days of treatment, compared with the other studied pastes, with CTZ exception, that presented the best results during the entire treatment period.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; Endodontics; Phytotherapy; Products with Antimicrobial Action; Calcium Hydroxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de calibração das amostras de <i>S. brasiliensis</i>	40
Figura 2. Curva de calibração das amostras de <i>X. americana</i>	40
Figura 3. MEV de dente humano mostrando túbulos dentinários.....	41
Figura 4. MO da superfície das amostras, em diferentes ângulos, após contaminação.....	42
Figura 5. MO da superfície externa das amostras após o tratamento com oito dias, com as pastas experimentais.....	43
Figura 6. MO da superfície externa das amostras após o tratamento com vinte e oito dias, com as pastas experimentais	43
Figura 7. Ensaios de verificação de turvação em todos os grupos estudados.....	44
Figura 8. Ensaios realizados pelo método da Bile Esculina e do caldo BHI, contendo 6,5 % de NaCl.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais, quanto à pasta utilizada, o número de amostras e a duração do tratamento.....	35
Tabela 2. Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos obtido a partir das plantas medicinais estudadas.....	38
Tabela 3. Halos de inibição obtido no estudo de potência do extrato nebulizado e da pasta formulada de <i>S. brasiliensis</i> frente a <i>E. faecalis</i>	39
Tabela 4. Halos de inibição obtido no estudo de potência do extrato nebulizado e da pasta formulada de <i>X. americana</i>	39

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CEP – Comitê de ética em pesquisa

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CTZ – Cloranfenicol, tetraciclina e óxido de zinco

DMSO - Dimetilsulfóxido

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Óptica

pH – Potencial hidrogeniônico

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Referencial Teórico.....	15
2.1. Infecções Endodônticas.....	15
2.2. Medicação intracanal.....	18
2.3. Fitoretapia.....	22
3. Objetivos.....	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. Metodologia.....	30
4.1. Local da pesquisa.....	30
4.2. Universo da pesquisa.....	30
4.3. Amostras.....	30
4.4. Tecnologia de Obtenção dos Extratos.....	31
4.5. Análise da Potência Microbiológica.....	31
4.5.1 Cepas Microbianas.....	31
4.5.2. Preparação do Inoculo Microbiano.....	32
4.5.3. Ensaio Microbiológico por Difusão em Meio Sólido.....	32
4.6. Preparo da pasta intracanal.....	33
4.7. Eficácia sobre Dentina Infectada.....	34
4.7.1. Preparo dos Blocos Dentários.....	34
4.7.2 Contaminação dos Blocos Dentários.....	34
4.7.3 Preparo dos grupos e aplicação das pastas.....	35
4.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
4.9. Microscopia Óptica (MO).....	36
4.10. Ensaio de comprovação de crescimento bacteriano.....	
4.11. Análise estatística.....	
5. Resultados.....	38
5.1. <i>Screening</i> Microbiológico.....	38

5.2. Estudo de Potência dos Extratos Nebulizados e da Pasta Intracanal.....	38
5.3 Eficácia sobre dentina infectada.....	41
5.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	41
5.3.2. Microscopia Óptica (MO).....	42
5.3.3. Ensaios de confirmação da ausência ou presença de <i>E. faecalis</i>	44
6. Discussão.....	46
7. Conclusão.....	50
Referências.....	51
Apêndices.....	62

1. INTRODUÇÃO

O principal objetivo da odontologia é manter ou melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Este objetivo pode ser conseguido pela prevenção de doenças, pelo alívio da dor, aperfeiçoamento da eficiência mastigatória, aprimoramento da fonética e pela melhor aparência. Para alcançar muitos desses objetivos há necessidade da reposição ou alteração da estrutura dentária existente. Sendo assim, o principal desafio tem sido o desenvolvimento e a seleção de materiais que sejam biocompatíveis e que suportem as condições adversas do sistema estomatognático, entre elas a ação das inúmeras bactérias que compõem a flora bucal (MATTOS et al., 2008).

O ramo da odontologia responsável pelo estudo de doenças e alterações na polpa do dente é conhecido como Endodontia. O tratamento para remoção da polpa é chamado de tratamento endodôntico, e muitas vezes são necessárias diversas sessões para que o tratamento seja concluído (SOLANKI, 2012).

Na literatura não há evidência de que a instrumentação mecânica sozinha tenha capacidade de eliminar completamente as bactérias do sistema de canais radiculares. Para auxiliar essa instrumentação é necessário algo que possa neutralizar os microrganismos presentes no interior dos canais radiculares, como o uso de irrigantes e medicações intracanal utilizadas entre as sessões do tratamento (MITTAL e JAIN, 2012).

A medicação intracanal utilizada em Endodontia é indicada com o objetivo de eliminar microrganismos que sobreviveram ao preparo do canal, controlar o exsudato persistente e possuir ação destrutiva aos osteoclastos presentes na reabsorção radicular externa. Desta forma, esta medicação deve apresentar algumas características como ser inofensivo aos tecidos periapicais, ser reabsorvido quando extravasado, possuir propriedades anti-sépticas, ser manipulado com facilidade, possuir adesão satisfatória as paredes dos condutos radiculares, não pigmentar o dente e ser de baixo custo. Entretanto nenhum medicamento capaz de preencher todos esses requisitos foi desenvolvido (KRAMER et al., 2000; BASRANI et al., 2004; CUNHA et al., 2005; RAMOS et al., 2012).

As bactérias estão diretamente relacionadas aos casos de insucessos no tratamento endodôntico (RICUCCI, SIQUEIRA, 2008). Love (2001) relata que em diversos estudos houve um aumento nos níveis de resistência aos antimicrobianos, como o que ocorre com o microrganismo *Enterococcus faecalis*, capaz de sobreviver nos túbulos dentinários e de

reinfectar um canal obturado. De acordo com Pinheiro et al. (2003), há uma maior prevalência desta espécie em dentes com tratamento falho, inclusive em casos onde o retratamento foi realizado.

Um material classicamente empregado em Endodontia, desde sua introdução por Hermann em 1920, é o hidróxido de cálcio, que é uma substância alcalina, com pH aproximado a 12,5, o qual dissocia-se em íons de cálcio e hidroxila. Apresenta propriedades biológicas satisfatórias, como atividade antimicrobiana, inibição da reabsorção dentária, e indução de remineralização, sendo recomendado para diversas situações clínicas. Entretanto, sua atividade é questionada contra o *Enterococcus faecalis*, um dos microrganismos mais resistentes nas infecções endodônticas (ESTRELA et al., 1994; FULZELE et al., 2011; REZENDE et al., 2011), sendo necessária a busca de novos materiais que possuam tal ação contra este e outros microrganismos presentes nas infecções endodônticas.

O mercado que envolve a medicina natural tem gerado grande circulação de capital, incentivando as indústrias farmacêuticas a investir na descoberta de novas substâncias de valor terapêutico. Os medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Devem ser produzidos de forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia terapêutica do usuário, entretanto, a sua efetividade é o resultado de uma longa cadeia de fatores: pesquisa e desenvolvimento, produção, controle da qualidade, distribuição, informações confiáveis para profissionais de saúde e público, diagnóstico, prescrição, acesso financeiro, dispensação, adesão ao tratamento e farmacovigilância (PÉCOUL et al., 1999).

No semiárido brasileiro, região que ocupa 11,5% do território nacional, estima-se haver oito mil espécies vegetais. Diante dessa vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novas moléculas bioativas é de fundamental importância o estudo farmacológico da flora dessa região, ainda pouco estudada sob esse aspecto (NOVAIS et al., 2003).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi realizar um estudo comparativo da eficácia *in vitro* entre pastas intracanal comercializadas e formuladas, tendo como matéria-prima extratos vegetais, trazendo a possibilidade da bioprospecção de novos produtos de uso endodôntico desenvolvidos a partir de plantas medicinais do semiárido brasileiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Infecções Endodônticas

Os cirurgiões-dentistas, ao realizarem um tratamento endodôntico, precisam lançar mão de meios adequados para eliminar ou reduzir o número de bactérias situadas no interior dos canais radiculares, principalmente em dentes com necrose pulpar. A cadeia asséptica deve ser mantida durante todas as fases do tratamento para que o ambiente no interior do canal radicular seja adequado e permita o reparo dos tecidos periapicais (TOMAZINHO et al., 2007; KANUMURU et al., 2012).

A redução bacteriana dentro do sistema de canais é conseguida através da limpeza mecânica e química. A dificuldade encontrada no tratamento endodôntico em tornar os canais radiculares um meio livre de microrganismos está relacionada à complexidade e a morfologia dos canais, com a presença de istmos, ramificações, reentrâncias e túbulos dentinários, impedindo uma correta limpeza e sanificação. O sistema de canais radiculares varia de acordo com a posição e características de cada elemento dentário, e a presença dessas alterações ao longo do canal radicular propicia um local de proteção aos microrganismos diante da ação do preparo químico-mecânico (LEONARDI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; VIDANA et al., 2011, KANUMURU et al., 2012).

Bactérias e seus produtos metabólicos são considerados agentes etiológicos primários da mortificação pulpar e da lesão periapical, desta forma, sua eliminação é de vital importância no sucesso da terapia endodôntica (TOMAZINHO et al., 2007; TAVARES et al., 2011). Estudos identificaram mais de 700 espécies de bactérias presentes na cavidade oral e qualquer paciente pode apresentar uma variedade entre 100 a 200 espécies diferentes (PASTER et al., 2006). Devido à natureza polimicrobiana das infecções endodônticas, diversos estudos têm sido feitos para verificar quais as bactérias mais frequentemente relacionadas à infecção primária, e aos casos de insucesso na terapia.

A maior parte destas infecções são mistas, com predomínio de bactérias anaeróbias. Entretanto, uma das espécies de bactérias frequentemente encontradas em canais radiculares de dentes submetidos a tratamentos endodônticos é o *Enterococcus faecalis*, que é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa. Em estudos anteriores, *E. faecalis* foi a bactéria mais presente em casos de insucesso endodôntico, sendo isoladas de patologias relacionadas a

canais radiculares (MOLANDER et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003a; PINHEIRO et al., 2003b; DOTTO et al., 2006; SAKAMOTO et al., 2007).

As infecções endodônticas que apresentam *E. faecalis* representam um problema para o tratamento devido a capacidade dessa bactéria poder existir como cultura pura, sem o suporte de outro microrganismo, e devido aos seus fatores de virulência e resistência a antibioticoterapia (VIDANA et al., 2011). Esse microrganismo também pode resistir a situações extremas, inclusive a ambientes que seriam tóxicos para muitas bactérias, incluindo os com alto teor de sal, temperaturas extremas (15 – 60°C), e corantes como o azul de metileno a 0,1% (HUBBLE et al., 2003).

O *E. faecalis* exibe uma plasticidade genética que lhe permite habitar em diferentes locais devido a sua capacidade de expressão ou supressão de diferentes genes (FISHER e PHILLIPS, 2009). Esta bactéria possui a capacidade de síntese de peptídeos antibacterianos, também conhecido como enterocinas, o que poderia ser uma vantagem extra para persistir em um ambiente colonizado por diferentes microrganismos que competem pelos nutrientes, como é o caso da microbiota oral (PADILLA et al., 2012). Também possui uma capacidade de invadir túbulos dentinários podendo penetrar em até 1000 µm, dificultando sua remoção e fazendo com sejam capazes de resistir ao preparo mecânico do canal radicular (DISTEL et al., 2002; KANUMURU et al., 2012). Estudos mostram a capacidade de colonização e formação de biofilme em canais radiculares de dentes humanos, sendo as bactérias capazes de sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade nutricional, para crescerem quando a nutrição estiver favorável (DISTEL et al., 2002; GEORGE et al., 2005; WANG et al., 2011).

A escolha do *E. faecalis* como microrganismo teste em diversos estudos, está explicado pela sua resistência em casos de tratamento endodôntico falho, em que apenas a instrumentação e irrigação do canal radicular não são suficientes para sua eliminação e desinfecção durante o tratamento, além disso, é capaz de suprimir a ação dos linfócitos e de formar biofilmes, resistindo a ação de anticorpos e antibióticos, contribuindo para a falha no tratamento endodôntico (KANUMURU et al., 2012).

Outro fator de patogenicidade desse microrganismo é a produção de proteases, como a gelatinase e a serina protease. A gelatinase é uma enzima que possui a função de eliminar proteínas defeituosas da superfície da célula bacteriana (WATERS et al., 2003; SALAH et al., 2008). Testes fenotípicos demonstram que 70% das cepas de *E. faecalis* são capazes de produzir gelatinase (SEGLEY et al., 2005), entretanto seu gene pode ser encontrado em

apenas 37,5% das cepas isoladas *in vitro* (SALAH et al., 2008). Estudos indicam que a expressão do gene gelatinase contribui para o aumento da disseminação da bactéria e foi associado com um aumento da adesão entre o *E. faecalis* e a dentina *in vitro* (HUBBLE et al., 2003; WATERS et al., 2003).

Acredita-se que a serina protease também é responsável pela adesividade do *E. faecalis* com a dentina, com a capacidade de permanecer estável e ativa em um longo intervalo de pH elevado, sugerindo que mesmo em um ambiente alcalino estas serinas proteases permanecem ativas. A serina protease é uma enzima segregada, por isso seu papel na aderência não é prontamente aparente, podendo ser responsável por uma adesão indireta, expondo sítios de ligação para as adesinas do *E. faecalis* ou modificando as adesinas (HUBBLE et al., 2003).

A substância de agregação presente na superfície da *E. faecalis* é demonstrada *in vivo* na formação de grandes agregados e podem contribuir para a patogênese dessa bactéria. A presença dessa substância aumenta a hidrofobicidade da célula, atrasando ou prevenindo a fusão com lisossomos. Outra proteína presente na superfície da *E. faecalis* é a adesina de colágeno de *E. faecalis*, que tem sido relacionada a ligação ao colágeno e a dentina (HUBBLE et al., 2003; SALAH et al., 2008). A proteína expressa em células enterocócicas, é outro fator de virulência presente na *E. faecalis*, que promove adesão, colonização e evasão do sistema imune, contribuindo também para a sua resistência antimicrobiana (OLSEN et al., 2012; PADILLA et al., 2012).

Os fatores de virulência relatados ajudam a explicar a resistência do *E. faecalis* aos antibióticos, que podem sofrer variações no padrão de resistência, dependendo da área geográfica e do sítio onde ocorre a infecção. No estudo realizado por Salah et al. (2008) é visto que isolados de *E. faecalis* foram sensíveis ao cloranfenicol, ampicilina, vancomicina, ciprofloxacina e teicoplanina, mas que eram menos sensíveis à eritromicina. Estudos realizados por Pinheiro et al. (2004), mostraram que isolados de espécies orais de *E. faecalis* foram sensíveis *in vitro* a amoxicilina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, e sensíveis em menor grau a eritromicina, moxifloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacina.

O canal radicular devido a sua baixa vascularização é normalmente inacessível ao sistema imune. Casos de infecções endodônticas pobremente tratadas podem evoluir para uma infecção sistêmica ou uma endocardite bacteriana em indivíduos debilitados (GEIJERSSTAM

et al., 2006). Soluções irrigadoras são utilizadas como coadjuvante na terapia endodôntica com o objetivo de eliminar as bactérias que sobreviveram o preparo mecânico. Soluções irrigadoras como a água ozonizada, ozônio gasoso, hipoclorito de sódio a 2,5% e clorexidina a 2% foram utilizadas em canais infectados com *E. faecalis* por 60 dias, sendo que nenhuma solução demonstrou efeito antimicrobiano por um tempo de contato de 20 minutos (ESTRELA et al., 2007).

Existe grande dificuldade na eliminação das bactérias do gênero *Enterococcus* do interior dos canais radiculares, sendo o *E. faecalis* capaz de sobreviver sozinha, adaptando-se as situações adversas. Normalmente o *E. faecalis* não se encontra no primeiro contato, mas podem penetrar nos canais por microfraturas em restaurações inadequadas levando a contaminação dos canais dentários, e sua remoção é dificultada pela sua resistência ao preparo químico-mecânico e ao hipoclorito de sódio (ZENDER, GUGGENHEIM, 2009).

2.2. Medicação intracanal

A eliminação de bactérias é um dos principais objetivos do tratamento endodôntico, e objetivando a redução de microrganismos no interior do canal radicular, é necessária uma medicação que possa agir como medida auxiliar na etapa de preparo para o controle das infecções endodônticas. Em razão disso, a odontologia vem realizando inúmeros estudos com diferentes formulações e medicações intracanaís na busca de um fármaco que proporcione melhores propriedades antimicrobianas e seja biologicamente compatível (OLIVEIRA et al., 2010).

Para que essa medicação seja adequada à prática endodôntica, é necessário que ela seja de fácil manipulação e facilmente inserida e removida nos canais dentários, favorecendo o contato com os tecidos; como também que tenha capacidade de atuar à distância, tendo em vista tanto o efeito antimicrobiano, quanto a capacidade de atuar contra reabsorções dentinárias radiculares (BASRANI et al., 2004; CUNHA et al., 2005; RAMOS et al., 2012).

O hidróxido de cálcio há muito tempo vem sendo a medicação de primeira escolha na terapia endodôntica, possuindo baixa solubilidade em água. Apresenta-se sob a forma de um pó branco e é uma excelente substância utilizada como medicação intracanal devido as suas características biológicas. A atividade antimicrobiana, seu potencial de induzir a formação de

tecido mineralizado e a capacidade de reparação tecidual são qualidades importantes para o tratamento endodôntico, justificando a recomendação do seu uso (ESTRELA, HOLLAND, 2003; PANZARINI et al., 2012).

A eficácia intracanal do hidróxido de cálcio é bem aceita, mas a duração da terapia é importante e deve ser respeitada, pois a alcalinização da dentina depende da penetração de íons hidroxila nos seus túbulos, podendo ser atrasado pela habilidade de tamponamento que a dentina apresenta. Para que a terapia com o hidróxido de cálcio seja eficaz, é necessário que o medicamento permaneça no canal por tempo suficiente até alcançar e eliminar as células bacterianas, agindo à distância e neutralizando os resíduos de agentes agressivos, podendo demorar de duas a quatro semanas para que o efeito da alcalinização seja alcançado, o que altera o crescimento, o metabolismo e a divisão celular bacteriana (ESTRELA et al., 1999; CAMARGO et al., 2003; PANZARINI et al., 2012).

As propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio podem ser atribuídas ao seu potencial alcalino e sua habilidade de destruir a membrana citoplasmática, causando danos no DNA bacteriano. A capacidade de desnaturar proteínas leva a inibição de enzimas essenciais a células bacterianas. O potencial mineralizador e reparador do hidróxido de cálcio ocorrem devido a sua ação sobre a fosfatase alcalina, ativando enzimas teciduais, produzindo o efeito mineralizante através da migração e diferenciação celular (ESTRELA et al., 1995; AN et al., 2012; DELGADO et al., 2012; SADHASIVAM et al., 2012).

Estrela e Holland (2003) fizeram uma retrospectiva da literatura sobre o hidróxido de cálcio, e concluíram que sempre que possível é necessário tempo à pasta de hidróxido de cálcio para manifestar seu potencial de ação, e que esta pasta possui um amplo espectro de ação, independente da capacidade de metabolização dos microrganismos, já que o sítio de ação dos íons hidroxila e cálcio presentes na medicação incluem as enzimas presentes na membrana citoplasmática, promovendo a inativação dessas enzimas.

É importante considerar alguns fatores no uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, principalmente os relacionados com a duração da terapia e a associação de substâncias ao hidróxido de cálcio. Para ser usado como pasta intracanal, o hidróxido de cálcio necessita de um veículo que determina a velocidade de sua dissociação em íons cálcio e hidroxila, e sua capacidade de solubilização nos tecidos apicais (CAMARGO et al., 2003; PANZARINI et al., 2012).

Diferentes substâncias adicionadas ao hidróxido de cálcio visam melhorar algumas de suas propriedades, como sua ação antimicrobiana, a taxa de dissociação iônica, suas propriedades físico-químicas, sua biocompatibilidade, potencializando suas características e viabilizando sua utilização. O melhor veículo para cada caso deve ser analisado, verificando-se também se o pH alcalino inativa as substâncias utilizadas na pasta (CAMARGO et al., 2003; ESTRELA, HOLLAND, 2003; PANZARINI et al., 2012). O veículo em que o hidróxido de cálcio é utilizado desempenha um importante papel de suporte, dando as pastas importantes características químicas como dissociação, difusão e a habilidade de penetrar e preencher os canais, fornecendo importante potencial antimicrobiano e remineralizador (ESTRELA et al., 1999; LIMA et al., 2012).

A pasta de hidróxido de cálcio pode ser preparada com diferentes veículos, como a solução aquosa de metilcelulose, água destilada, solução fisiológica, solução anestésica, polietilenoglicol, propilenoglicol, paramonoclorofenol canforado e óleo de oliva. O veículo ideal deve permitir uma liberação gradual e lenta dos íons de cálcio e hidroxila. Baseado nas propriedades químicas possuídas pelo hidróxido de cálcio quando associados a veículos aquosos e oleosos, alguns autores indicam o uso de veículos hidrossolúveis como água destilada e solução salina, para potencializar suas propriedades (ESTRELA et al., 1995; SONODA et al., 2002; FULZELE et al., 2011).

Apesar de suas excelentes propriedades biológicas, o hidróxido de cálcio possui algumas desvantagens, como a longa duração do tratamento, pois a liberação de íons e a alcalinização do meio necessitam de tempo. Também é relatado o enfraquecimento da estrutura dental após a terapia prolongada e a resistência de alguns microrganismos (DOMINGUES et al., 2005; ROSEMBERG et al., 2007; FULZELE et al., 2011).

A avaliação da eficácia antimicrobiana de medicamentos intracanal baseados em hidróxido de cálcio frente a cepas de *E. faecalis* foi avaliado por Lima et al. (2012), ao utilizarem a pasta Calen[®] isolada, associada com paramonoclorofenol canforado e a pasta associada com clorexidina. Todas as pastas reduziram a presença de *E. faecalis*, com melhores resultados com a associação do hidróxido de cálcio com o paramonoclorofenol canforado ou com a clorexidina.

Em estudo realizado por Silveira et al. (2011), para verificar as propriedades antimicrobianas *in vitro* de quatro pastas com formulações à base de hidróxido de cálcio contra *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus mutans*,

encontraram como resultado que o *E. faecalis* foi o microrganismo mais resistente as pastas estudadas. No estudo de Javidi et al. (2011), apesar do hidróxido de cálcio conseguir diminuir a concentração de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis*, ele não foi capaz de eliminar o microrganismo dos canais radiculares de dentes humanos em estudo *in vitro*.

Como citado anteriormente, o veículo é capaz de mudar as propriedades do hidróxido de cálcio, podendo potencializar ou diminuir seus efeitos. Preparo de pastas associando hidróxido de cálcio com glicerina não apresentaram nenhum efeito contra *E. faecalis* (TURK et al., 2009).

Estudo realizado por Pavaskar et al. (2012), para avaliar a eficácia de medicações a base de hidróxido de cálcio, como a pasta Vitapex[®] (hidróxido de cálcio + iodofórmio), linezolida e uma combinação de linezolida com hidróxido de cálcio, contra *E. faecalis* em pré-molares humanos extraídos; verificaram que o antibiótico linezolida isolado foi o mais eficiente contra o *E. faecalis*, seguido da combinação deste antibiótico com o hidróxido de cálcio, do hidróxido de cálcio isolado e da Vitapex[®].

Delgado et al. (2012) em estudo para avaliar a eficácia do hidróxido de cálcio e da clorexidina gel na eliminação de *E. faecalis* intratubular, observou que ambos os grupos apresentaram redução significativa nas unidades formadoras de colônias e na porcentagem de células bacterianas viáveis. Os resultados mostraram que a atividade da clorexidina gel é superior ao hidróxido de cálcio, e que a adição do hidróxido de cálcio a clorexidina mostra atividade antimicrobiana semelhante ao da clorexidina isolada.

Madhubala et al. (2011) verificou a atividade do extrato etanólico de própolis como medicação intracanal e comparou com hidróxido de cálcio e com uma mistura de antibióticos contendo ciprofloxacina, metronidazol e minociclina. A bactéria utilizada para teste também foi a *E. faecalis*, e os resultados mostraram que em apenas dois dias a própolis foi capaz de reduzir a quantidade de cepas presentes, seguida pela mistura de antibióticos e com o hidróxido de cálcio apresentando os piores resultados.

Outra pasta utilizada em endodontia é a pasta CTZ, composta de cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol, sendo indicada para uma técnica de endodontia em que não é necessária a instrumentação dos canais radiculares. Sua composição é de uma parte de cloranfenicol (500 mg), uma parte de tetraciclina (500 mg), e duas partes de óxido de zinco (1 g) e uma gota de eugenol (GONZÁLEZ-NUÑEZ et al., 2010). Essa pasta diminui os custos

envolvidos na técnica clássica da endodontia e possui um protocolo de simples execução, podendo ser indicada independente do diagnóstico pulpar (OLIVEIRA, COSTA, 2010).

Cappiello (1964) preconizou o tratamento pulpar de dentes decíduos com a pasta CTZ, mostrando que em sete meses de controle, nenhuma alteração patológica foi detectada nos dentes tratados no estudo, com resultados clínicos, radiográficos e atividade antimicrobiana satisfatórios.

Avaliando a atividade antimicrobiana da pasta CTZ, ela apresenta resultados favoráveis contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Devido a sua composição com dois antibióticos de amplo espectro de ação e da presença do óxido de zinco e eugenol que também possuem ação antimicrobiana, esta pasta apresenta ótimos resultados frente a microrganismos da cavidade bucal, sejam eles bactérias gram-positivas, gram-negativas ou até mesmo fungos (PIVA et al., 2009; GONZÁLEZ-NÚÑEZ et al., 2010).

Amorim et al. (2006) em estudo para avaliar a ação antimicrobiana da pasta CTZ, realizou ensaios pelo método de difusão em ágar e pelo teste de contato direto. Neste estudo, foram utilizadas cepas *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *C. albicans*, sendo testadas além da CTZ, as pastas Guedes-Pinto, a de hidróxido de cálcio, a OZE e a Vitapex®. Os resultados mostraram que pelos dois métodos a pasta CTZ obteve os melhores resultados nos microrganismos avaliados. Pecoraro e Reis (1999) também avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta CTZ pelo método de disco-difusão em amostras de 25 dentes decíduos com necrose pulpar que foram inoculados em meio agár-sangue, e após 24 horas, a microbiota foi semeada em meio Agar Muller Hinton com discos de papel, contendo a pasta CTZ. O resultado demonstrou que a pasta foi eficiente em 21 das 25 amostras.

2.3. Fitoterapia

Plantas têm sido utilizadas para fins terapêuticos em diferentes culturas por muitos séculos. O interesse popular no uso de plantas medicinais e o desenvolvimento de medicamentos a partir dessas plantas têm crescido consideravelmente nos últimos anos. A necessidade de garantir o uso sustentável dos recursos naturais associada com a preocupação da perda de biodiversidade gera uma busca de compostos bioativos com propriedades medicinais, e plantas que possam ser fontes potenciais de compostos com propriedades

favoráveis. O interesse por medicamentos fitoterápicos tem sido visado também pela comunidade científica, que procura uma alternativa para os fármacos já existentes, que possua menos efeitos indesejáveis, fácil aceitação pela comunidade e que tenha custo reduzido (VOSS et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; SARAIVA et al., 2011).

A descoberta de novos compostos bioativos, também chamados de princípios ativos, é de grande importância para a odontologia, pois infecções na cavidade bucal são frequentes, sejam de origem bacteriana ou fúngica. Além do *E. faecalis*, outras bactérias como o *Streptococcus mutans* e o *Staphylococcus aureus* estão associados a problemas endodônticos e periodontais, além de serem microrganismos envolvidos na cárie dentária (SILVEIRA et al., 2011). Além do composto bioativo a planta dispõe do fitocomplexo, um conjunto de todas as substâncias presentes, que atua simultaneamente com o princípio ativo, podendo ser influenciada por fatores endógenos ou exógenos ao vegetal (CAPASSO et al., 2000). Apesar de o Brasil possuir uma grande biodiversidade, com grande potencial fitoterápico, há uma carência de estudos que avaliam o uso de extratos e produtos vegetais para fins odontológicos (PEREIRA et al., 2011).

Existe uma grande variedade de plantas medicinais com potencial terapêutico. Algumas delas são capazes de realizar a síntese de metabólitos secundários como substâncias de defesa frente a microrganismos, como bactérias, fungos, parasitas, vírus e outros agentes. Os metabólitos sintetizados possuem composição química variada, mas sabe-se que compostos como terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonóides), compostos nitrogenados (alcalóides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora, possuem atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2003; RESCHKE et al., 2007).

Na região Nordeste do Brasil conhecimento tradicional sobre plantas medicinais tem desempenhado um papel importante na medicina popular (SIQUEIRA et al., 2012). A Caatinga, bioma exclusivo do Brasil, consiste no tipo de vegetação predominante do semiárido brasileiro, composta de vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo onde é encontrado uma diversidade de espécies de plantas nativas. Esse bioma oferece uma variedade de recursos de plantas e animais para a sobrevivência dos habitantes daquela região, e a grande variedade da vegetação é utilizada na medicina tradicional, com o uso de cascas, folhas, frutos, sementes e raízes (DAMASCENO et al., 2010).

Dentre a diversidade de plantas existentes na Caatinga, destaca-se uma planta da família Anacardiaceae, chamada *Schinopsis brasiliensis* Engl., popularmente conhecida como Braúna. É uma planta importante para a população da região, pois é utilizada como medicamento natural e suas diferentes partes, como casca, tronco, folha e frutos têm sido utilizadas em medicina popular para diversas patologias, incluindo gripe, febre, tosse e diarreia (ALBUQUERQUE, 2006; AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007).

S. brasiliensis Engl. apresenta como principais compostos do metabolismo secundário: tanino pirogálico, resina, fenóis, flavonóides, leucocianidina, flavona, alcalóide, albumina e aldeído (DANTAS, 2002). Em estudo sobre o conhecimento botânico tradicional em uma comunidade rural situada no agreste do estado de Pernambuco, foram identificadas mais de 108 espécies de plantas distribuídas em 10 categorias. Dentre essas espécies, a *S. brasiliensis* foi mencionada como de uso medicinal e comestível (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 2002).

O efeito antimicrobiano do extrato seco de partes de algumas plantas, entre elas a *S. brasiliensis* Engl., foi testado sobre várias espécies de bactérias. *S. brasiliensis* apresentou a melhor atividade sobre todas as cepas de *S. aureus*, sendo o extrato metanólico mais ativo (SARAIVA, 2007).

Extratos hidroalcoólicos da *S. brasiliensis* foram testados contra bactérias da cavidade oral, obtendo halos de inibição favoráveis contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (SILVA, 2011; SILVA et al. 2012). Acredita-se que a atividade antimicrobiana e antioxidante encontrada em *S. brasiliensis* está relacionada com a concentração de componentes fenólicos presentes, particularmente nos taninos, que representam 55 % do teor de fenólicos totais (SARAIVA et al., 2011). Plantas usadas como antimicrobianos proporcionalmente apresentam níveis mais altos de taninos quando comparados a plantas que são utilizadas como antidiarreicas ou antidiabéticas (SIQUEIRA et al., 2012).

A espécie *Croton campestris* A. trata-se de arbusto 1,0-1,5m alt., ereto, ramos cilíndricos e indumento denso estrelado (MEDEIROS et al., 2008). Apresenta largo uso popular devido ao seu caráter depurativo, utilizado no combate á escrofulose, doenças venéreas, impigens, tumores, moléstias de pele, reumatismo, úlcera do útero, diarreia e artritrismo (MATIAS et al., 2010). O gênero *Croton* possui grande quantidade de diterpenos: velamolona, velamona e acetato de velamolona. Alguns trabalhos ainda indicam a presença de quatro flavonóides O-glicosilados na espécie *Croton campestris* A. (SANTOS et al., 2005).

Este gênero detém também expressiva relevância econômica, alicerçada em seu conteúdo de óleos essenciais e diversas substâncias ativas como terpenóides e alcalóides.

Croton é oriundo do grego *crston* que significa “carrapato” (*Ixodes ricinus* L.) uma alusão à semelhança das sementes de seus representantes com aquele inseto (BENIGNI, 1968). Nomes populares da *Croton campestris* – “Velame”, “velame-do-campo” (BA, MG); “velame-de-bode” (BA). Quanto a sua distribuição geográfica e habitat podemos citar – Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Há registros em campos rupestres (BA, MG), zona de transição campo rupestre-cerrado (GO, MG), zona de transição campo rupestre-caatinga (BA), cerrado (MT, GO, MG), cerrado degradado (SP, MG), transição cerrado-floresta semidecidual (BA), cerrado-ralo (GO), cerradão (SP), campo sujo (MT, MG), campo recém-queimado (DF, MG) e caatinga (BA). Na área estudada ocorre em campos rupestres, em solos areno-pedregosos e afloramentos de rochas quartzíticas (MEDEIROS et al., 2008).

Dentre as atividades farmacológicas experimentalmente comprovadas para o gênero Croton coloca-se em destaque o seu potencial antiinflamatório, antiulcerogênico, antidiabético, inibidores da enzima acetilcolinesterase entre outras (PALMEIRA et al., 2006).

A *Spondias mombin* L. é uma Anacardiaceae, tratando-se de uma árvore frutífera, encontrada naturalmente nas Índias ocidentais, sul do México, Peru, Brasil e muitos países tropicais da África, sendo popularmente conhecida como cajazeira. É utilizado na medicina tradicional como diurético, febrífugo, emético, utilizado no tratamento de disenterias, hemorroidas, gonorreia e leucorréia. Além de ter sido notificado seu poder antimicrobiano (ABIODUN et al., 2006). Segundo Ayoka et al. (2005), esta planta também pode ser usada no gerenciamento de transtornos psiquiátricos.

A análise fotoquímica do extrato da cajazeira mostrou que esta planta é rica em compostos biodegradáveis produzidos naturalmente. De forma que, o ácido ascórbico (AA) foi identificado como o principal composto químico da planta. Foram isolados também a riboflavina (RB), tiamina (TH) e ácido nicotínico (NA) (Obi-Egbedi et al., 2010). De acordo com o estudo de Njoku et al. (2007), a espécie *S. mombin* contém taninos, flavonoides, saponinas, alcaloides e fenóis.

A *Cereus jamacaru* pertence a família das Cactaceae, popularmente conhecido como mandacaru, é um cacto colunar (DAVET et al., 2008). Encontrada na caatinga, utilizada como fonte de alimento para o gado no Nordeste brasileiro em períodos de seca. (SCHWARZ et al.,

2010). Na medicina popular toda a planta é usada no tratamento do escorbuto e nas afecções do aparelho respiratório e renal, e é utilizado também como diurético (Agra et al., 2007; Agra et al., 2008).

Davet et al., 2008, o cardeiro ou mandacaru possui uma quantidade de proteína bruta que chega a mais de 10% e o resíduo mineral a 10,66%, dos quais 0,22% são em P₂O₅ e 5,61% em CaO. Segundo o mesmo trabalho esta planta também apresenta atividade antibacteriana. Segundo Araújo et al. (2008), a espécie *C. jamacaru* apresenta baixa concentração de taninos e flavonoides. De forma que, índios brasileiros fazem uso dessa planta em associação com outras para alcançar o efeito desejado. Embora em uma análise realizada por Schwarz et al. (2010), do extrato etanólico desta espécie detectou-se a presença de hordenina, tiramina, ácido oleico, ácido acético e cisteína.

Pertence a família Leguminosae Papilonoideae, teve sua origem no Brasil ou África conhecida vulgarmente por urinária, carrapicho, alfafa-do-campo, carrapinho, chapinha, ubiruana e zornia (DANTAS, 2007).

Os princípios ativos identificados são os seguintes: tanino catéquico, enóis, flavona, flavonóis, xantona, resina, saponina, albumina, alcaloide e glicose (DANTAS, 2007). Seu uso etnofarmacológico esta ligado ao tratamento de doenças venéreas, sendo também utilizado como diurético. A decocção da pranta é ingerida até que desapareçam os sintomas (AGRA, 2007; AGRA, 2008).

Outra planta encontrada na Caatinga que mostra atividade contra *E. faecalis*, é *Ximения americana* L. da família Olacaceae, que compreende 27 gêneros com aproximadamente 200 espécies. No Brasil encontram-se, aproximadamente, 13 gêneros e cerca de 60 espécies, sendo representado por plantas lenhosas, árvores ou arbustos. *X. americana* é uma planta que cresce em regiões tropicais e temperadas em todo o mundo, sendo comumente encontrada na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (SACANDE, VAUTIER, 2006; BRASILEIRO et al., 2008).

Existem relatos do uso terapêutico de todas as partes da *X. americana* na medicina tradicional. As raízes são utilizadas como antiséptico, para doenças mentais, febre, icterícia e dor de cabeça. As folhas são usadas no tratamento de sarampo, dor de dente e também como laxante. As cascas são usadas no tratamento de úlceras e a infusão do fruto é empregada para diarreia sanguinolenta. *X. americana* também é empregada popularmente para o tratamento de malária, infecções na pele, asma, anemia, inflamações, gastrite, reumatismo, câncer e

infecções bucais (OGUNLEY, IBITOYE, 2003; MEVY et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

O extrato da casca da *X. americana* demonstra atividade antimicrobiana e pode conter substâncias alternativas para o tratamento endodôntico. No estudo realizado por Silva et al. (2012), o extrato de casca da *X. americana* apresentou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus oralis*. Em estudo realizado por Costa et al. (2010), também foi encontrada atividade contra a *E. faecalis*.

Ao avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos da casca, das folhas e das raízes de *X. americana*, verificou-se que todos os extratos mostraram atividade, mas o extrato metanólico foi o mais ativo (OMER, ELNIMA, 2003). A ação de 67 extratos etanólicos de 50 espécies de plantas entre elas a *Ximenia americana* L., foi avaliada contra: *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis*. Dos extratos testados, 31 mostraram atividade antibacteriana apenas para bactérias Gram positivas. A *X. americana* apresentou atividade antibacteriana com uma concentração inibitória de 94 mg/ml apenas contra *E. faecalis* e *S. pyogenes* (KONÉ et al., 2004).

As sementes da *X americana* possuem óleo, glicosídeo cianogenético e benzaldeído (MATOS, 1987). A casca possui alcalóides, taninos pirogálico, fenóis, flavonóides, flavona, flavonóis, xantona, albumina, antocianina, antocianidina, chalcona, aurona, saponina, resina, amido e glicose (DANTAS, 2002).

Os constituintes químicos dos extratos aquosos e metanólicos das folhas, da casca do caule e da raiz da *X. americana*, foram analisados e verificou-se que os referidos extratos possuem carboidratos, na forma de açúcares, e amido solúvel, exceto para o extrato aquoso das folhas. Saponinas, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas foram observados em todos os extratos, exceto nos extratos das folhas, onde não foram encontradas antraquinonas. Flavonóides e taninos foram observados em todas as partes da planta já mencionadas, enquanto que os alcalóides estiveram sempre ausentes (JAMES et al., 2007).

Análise fitoquímica de *X. americana* indica a presença de flavonóides e taninos. Os flavonoides são fenóis que possuem inúmeras atividades biológicas incluindo efeito antiinflamatório, antialérgico e vasoprotetor; enquanto os taninos são utilizados como protetor de regiões inflamadas na cavidade bucal e no tratamento de feridas (OGUNLEY, IBITOYE, 2003).

Taninos são polifenóis que possuem amplo espectro e maior atividade antimicrobiana, quando comparados a outros polifenóis, possuindo sinergismo com antibióticos. Os taninos possuem a capacidade de suprimir alguns fatores da virulência bacterianos, tais como inibir a formação de biofilme, reduzir a capacidade de adesão ao hospedeiro e neutralizar toxinas bacterianas. Os taninos mais estudados são aqueles que inibem o crescimento de bactérias patogênicas, através da desestabilização da membrana citoplasmática, da permeabilização da membrana celular, da inibição de enzimas microbianas extracelulares, de ações diretas sobre o metabolismo microbiano ou da privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano, especialmente, micronutrientes minerais essenciais, como ferro e zinco (DAGLIA, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a eficiência *in vitro* de pastas intracanal formuladas a partir de plantas medicinais do semiárido brasileiro.

3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar um *screening* microbiológico nos extratos produzidos;
- Analisar a potência microbiológica dos extratos nebulizados produzidos e das pastas intracanal formuladas;
- Formular as pastas a partir dos extratos nebulizado das plantas selecionadas;
- Analisar a eficácia antimicrobiana *in vitro* das pastas formuladas em dentina humana infectada;
- Comparar a eficácia das formulações propostas com as pastas CTZ e Calen[®].

4. METODOLOGIA

4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM), do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

4.2 Universo da Pesquisa

A pesquisa utilizou dentes permanentes humanos extraídos devido à indicação terapêutica. Os dentes foram coletados através de doações de consultórios odontológicos particulares, após obtenção do consentimento livre e esclarecido para doação de dentes (Apêndice 1 e 2).

Como critérios de inclusão foram selecionados os dentes que apresentaram rizogênese completa. Os critérios de exclusão foram: dentes que não apresentaram a rizogênese completa, dentes submetidos a tratamento endodôntico anterior a exodontia, dentes com reabsorção, dentes submetidos à exodontias com odontosecção e dentes com fratura radicular.

A pesquisa foi realizada após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, CEP/UEPB, número 0424.0.133.000-11, considerando a Resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde.

4.3 Amostras

Para o *screening* microbiológico foram utilizadas 06 (seis) plantas medicinais com atividade antimicrobiana, com base no conhecimento popular e indicação dos raízes. São elas: ameixa casca (*Ximenia americana* L.), braúna folhas (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), cajazeira casca (*Spondias mombin*), cardeiro caule (*Cereus jamacaru* DC.), velame casca (*Croton campestris* ST. Hill.) e urinana folhas (*Zornia reticulata* SM.).

As amostras vegetais selecionadas foram coletadas na região do compartimento da Borborema-PB, a partir de plantas adultas selecionadas, respeitando-se a época e o horário ideal de coleta. Além disso, foram realizadas as exsiccatas para identificação etnobotânica e as análises de verificação da autenticidade das plantas medicinais estudadas.

Foram utilizados ainda as pasta Calen[®] e CTZ (Cloranfenicol, Tetraciclina, Óxido de Zinco e Eugenol) adquiridas no comércio local. E os excipientes farmacêuticos hidróxido de sódio e miristato de isopropila adquiridos na Henrifarma[®].

4.4 Tecnologia de Obtenção dos Extratos

As plantas foram submetidas ao processo de secagem em estufa com renovação e circulação de ar, à temperatura de 40 °C, até estabilização da umidade. Em seguida, o material foi triturado em moinho de rotor vertical, com granulometria definida em torno de 10 mesh.

Os extratos hidroalcoólicos das plantas selecionadas foram obtidos pelo método de maceração (a frio), nas concentrações de 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 (v/v) água:etanol. Assim, de cada planta estudada foram obtidos cinco extratos em diferentes proporções de solução hidroalcoólica.

Os extratos que obtiveram melhor resultados foram submetidos à secagem por nebulização em um aparelho *Spray Dryer*, da marca BUCHI[®], sendo obtidos por nebulização com o estabilizante farmacotécnico Aerosil 200[®], os quais foram calculados em relação à massa teórica final do nebulizado. No aparelho, os sistemas de alimentação e atomização foram constituídos por uma bomba peristáltica, um atomizador com agulha injetora (0,5 mm d.i.) sob pressão. Os extratos secos foram separados por sedimentação na base de um ciclone e a circulação do fluído aquecido nas temperaturas de entrada a 150 °C assegurada por um sistema de aspiração, co-corrente. Com temperatura de saída variando de 75 – 80 °C, sob um fluxo de alimentação de 3,3 mL.min⁻¹.

4.5 Análise Microbiológica

4.5.1 Cepas Microbianas

Para avaliação do *screening* e do estudo de determinação da potência microbiológica dos extratos nebulizados e das pastas intracanal foi utilizada cepa padrão *American Type*

Culture Collection (ATCC) 29212 de *Enterococcus faecalis*, a qual foi disponibilizada pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

4.5.2. Preparação do Inoculo Microbiano

O *Enterococcus faecalis* reativado foi mantido em tubos, contendo 10 mL de ágar nutriente inclinado e incubado a $37 \pm 0,5$ °C, por 24 horas. A suspensão do microrganismo foi obtido transferindo a cultura crescida sobre o meio inclinado, com alça estéril, para uma placa contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton para reativação, e após 24 horas, transferido para um tubo de ensaio contendo 3 mL de solução salina estéril.

O inoculo microbiano foi padronizado, conforme descrito na *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010) e na Farmacopéia Brasileira V edição (2010), em espectrofotômetro, marca Biospectro[®], no comprimento de onda de 625 nm, de modo a obter a transmitância de 85%, equivalente a 10^6 UFC/mL.

4.5.3. Ensaio Microbiológico por Difusão em Meio Sólido

Para o *screening* microbiológico e o estudo de potência, seguiu-se a metodologia empregada no ensaio microbiológico por difusão em meio sólido, método do cilindro, descrito na Farmacopéia Brasileira V edição (2010), utilizando o meio de cultura ágar Mueller-Hinton.

No primeiro ensaio foram adicionados 100 µL de cada extrato hidroalcoólico produzido em cilindros de aço inoxidável, com diâmetro externo de $8 \pm 0,1$ mm, diâmetro interno de $6 \pm 0,1$ mm e comprimento de $10 \pm 0,1$ mm. E no estudo de potência foi utilizado o extrato nebulizado previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, nas concentrações de 500, 300, 200, 100 e 50 mg/mL.

Foi produzido meio base através da adição de 20 mL de meio de cultura fundido em placas de Petri. Após a sua solidificação foi preparado à camada de superfície, a qual foi composta pelo meio de cultura adicionada do inoculo bacteriano. Assim para cada 100 mL de meio de cultura fundido e resfriado entre $48 \pm 0,5$ °C foi adicionado 1 mL do inoculo bacteriano.

O ensaio foi realizado com interpolação em curva de 5 X 1, no qual em cinco cilindro foram adicionados 100 µL de cada concentração dos extratos ou das pastas formuladas, e no

último a mesma concentração da cefalotina, antibiótico utilizado como padrão de referência. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $37 \pm 0,5$ °C, por 24 a 48 horas. Após o período de incubação a leitura dos testes foi realizada medindo em milímetro o diâmetro dos halos de inibição ao redor do cilindro com o auxílio de um paquímetro digital, sendo considerado como possuidor de atividade antimicrobiana, halo de inibição acima de 10mm.

Com as medidas dos halos foi traçado uma curva, buscando a reta de melhor ajuste entre os pontos, onde o eixo das abscissas representa a concentração da substância teste e o eixo das ordenadas representa a medida dos halos de inibição. Essa curva foi utilizada como referência para se determinar a potência antimicrobiana dos extratos nebulizados.

Foi obtida a resposta em baixa dose (L) e a resposta em alta dose (H), em relação à resposta do padrão utilizado, através dos cálculos abaixo, no qual a menor dose estabelecida deverá dar como resposta um halo de inibição maior que L e doses acima da correspondente a H dará respostas equivalentes, independente do aumento da dose.

$$\text{Resposta em baixa dose (L):} \quad L = \frac{[(3 \times 1c)] + (2 \times 2c) + (3c - 5c)}{5}$$

$$\text{Resposta em alta dose (H):} \quad H = \frac{[(3 \times 5c)] + (2 \times 4c) + (3c - 1c)}{5}$$

Onde: 1c = média dos halos obtidos da menor concentração

2c = média dos halos obtidos da segunda menor concentração

3c = média do padrão utilizado

4c = média dos halos obtidos da segunda maior concentração

5c = média dos halos obtidos da maior concentração

4.6 Preparo da pasta intracanal

As pastas intracanal foram formuladas a partir da determinação da menor dose (L) obtida no estudo de potência dos extratos nebulizados. As pastas foram manipuladas utilizando a concentração do extrato nebulizado obtida na curva de calibração + hidróxido de

cálcio na mesma proporção do extrato nebulizador, tendo a formulação de 1:1. Foi adicionado o miristato de isopropila na formulação até que a consistência semelhante ao creme dental fosse atingida. Após o preparo das pastas, estas foram submetidas a ensaio microbiológico como descrito no item 4.5.3.

O miristato de isopropila foi utilizado por ser um líquido claro, emoliente não oleoso rapidamente absorvido pela pele, incolor de boa fluidez, inodoro e com sabor suave. É utilizado como componente de bases semi-sólidas e como solvente para muitas substâncias aplicadas topicamente (GIL, BRANDÃO, 2007).

4.7 Eficácia sobre Dentina Infectada

4.7.1 Preparo dos Blocos Dentários

Para o teste da atividade antimicrobiana sobre dentina infectada utilizou-se a metodologia adaptada de Rezende et al. (2011) e Haapasalo e Orstavik (1987). Foram utilizados 72 dentes permanentes, os quais tiveram suas coroas removidas na junção cimento-esmalte por uma broca cilíndrica diamantada #3101 (KG Sorensen[®]) em alta-rotação sobre refrigeração. Em seguida, blocos de 5 mm de comprimento foram confeccionados do terço apical da raiz palatina do elemento dentário com disco diamantado #7020 (KG Sorensen[®]) em baixa-rotação sobre refrigeração.

Cada bloco foi instrumentado individualmente pelo mesmo operador com o auxílio de limas K-files #15 a #40 (Maillefer[®], Suíça) e alargados com brocas Gates-Glidden #3 (Maillefer[®]). A irrigação com hipoclorito de sódio a 1% foi utilizada durante toda a preparação mecânica. Os blocos foram secos e preenchidos com EDTA a 17% por 3 min, e logo após foram limpos e esterilizados em autoclave a 121°C por 30 min.

4.7.2 Contaminação dos Blocos Dentários

Os blocos foram contaminados com 10 µL do inóculo microbiano, contendo *Enterococcus faecalis*, sendo repetida a inoculação a cada 72 horas por 60 dias, totalizando 20 inoculações, conforme metodologia descrita por Rezende et al. (2011), sempre utilizando novas culturas de 24 horas preparadas conforme metodologia descrita no tópico 4.5.2. Os

blocos foram mantidos em estufas de cultura bacteriológica a $37 \pm 0,5$ °C.

Após dez inoculações, seis blocos foram retirados aleatoriamente, com a finalidade de se analisar e comprovar o crescimento de *E. faecalis*. Destes, dois foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), dois foram analisados por Microscopia Óptica (MO), os outros dois restantes foram lavados com 10 mL de solução salina estéril e imersos em tubos de ensaio com caldo BHI, homogêneos e incubados a $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$, por 48 horas. O crescimento microbiano foi visualizado pela turbidez do meio de cultura. Para comprovar o crescimento foi retirada uma alíquota do meio turvo e semeado em placa de petri, contendo meio de crescimento adequado para *E. faecalis*. O ensaio foi realizado em quintuplicata e também foi repetido após a vigéssima inoculação.

4.7.3 Preparo dos grupos e aplicação das pastas

Os blocos dentários foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme a tabela 1, utilizando as plantas que obtiveram os melhores resultados. Após 60 dias de inoculações sucessivas, os blocos foram irrigados com 5 mL de solução salina, secos com gazes e cones de papel absorventes esterilizados. Em seguida foram aplicadas as pastas intracanal, nos blocos correspondentes a cada grupo, os quais foram incubados a $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. A medicação foi removida a fim de se comprovar a inibição do *E. faecalis* inoculado nos túbulos dentinários pelas pastas testadas após dois períodos experimentais: 8 e 28 dias.

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais, quanto à pasta utilizada, o número de amostras e a duração do tratamento.

Grupos Experimentais	Pasta utilizada	Número de Blocos	Duração do tratamento (dias)
Grupo A	Pasta experimental à base de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	7	8
		7	28
Grupo B	Pasta experimental à base de <i>Ximenia americana</i> L.	7	8
		7	28
Grupo C	Pasta Calen [®] (S. S. White [®] , Wilmington, EUA);	7	8
		7	28
Grupo D	Pasta CTZ (Cloranfenicol, Tetraciclina, Óxido de Zinco e Eugenol)	7	8
		7	28

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Este ensaio foi utilizado com o objetivo de se comprovar a efetividade do método de contaminação dos blocos dentários por *E. faecalis*. Os dentes utilizados foram analisados em diferentes aumentos (x100, x200, x500, x1000, x2000, x3000 e x5000). Os elementos dentários foram analisados antes do processo de contaminação e os dentes contaminados foram analisado após a décima e vigésima inoculação, com a finalidade de se comprovar o crescimento bacteriano, através da presença de colônias de *E. faecalis* e/ou de biofilme entre os túbulos dentinários. Para isso foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da marca dpUNION®.

4.9 Microscopia Óptica (MO)

Este ensaio foi utilizado também com o objetivo de se comprovar a efetividade do método de contaminação dos blocos dentários por *E. faecalis*, como também da eficácia terapêutica das pastas utilizadas, após a sua aplicação.

Para a análise em MO, foi utilizado um microscópio digital da marca Hirox®, modelo KH-7700. Os dentes também foram preparados conforme o item 4.7.1, sendo analisados após a décima e vigéssima inoculação, com a finalidade de se comprovar o crescimento bacteriano, através da presença de colônias de *E. faecalis* e/ou de biofilme entre os túbulos dentinários. As análises também foram realizadas após a retirada das pastas com oito e vinte e oito dias de tratamento, para se verificar se houve uma boa eficácia terapêutica das pastas formuladas, quando comparadas com as controles. Os testes foram realizados com dois dentes de cada grupo em cada momento.

Para realizar a leitura no MO foi necessário utilizar o método de coloração de Gram nos blocos de dentina, com a finalidade de se observar a presença e/ou ausência de *E. faecalis*. Colocou-se em cada bloco uma solução de cristal violeta com auxílio de uma pipeta, a qual permaneceu em repouso por um minuto. Depois, o corante foi removido e nos blocos foram adicionados uma solução de lugol, a qual também permaneceu em repouso por um minuto. Logo em seguida, os blocos foram lavados com água corrente, e descorado com uma solução de álcool-acetona, deixando-se em repouso por cinco segundos, sendo novamente lavado com água corrente. Após isso, os blocos foram visualizados em MO.

4.10 Ensaios de confirmação da ausência ou presença de *E. faecalis* após a aplicação das pastas intracanal

Após a retirada da medicação intracanal, em 8 e 28 dias, foi realizado um ensaio para se comprovar se houve a inibição do *E. faecalis* nos túbulos dentinários. Para isso utilizou-se cinco dentes em cada grupo, os quais foram colocadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI estéril e incubados à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, por 48 horas. Após este período foi retirado uma alíquota e semeado em placa de Petri, contendo ágar Mueller Hinton, para identificar o crescimento bacteriano, com incubação a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, por 48 horas. Para confirmar a presença de *E. faecalis* foi realizado dois testes, os quais são utilizados para isolamento e identificação presuntiva do *E. faecalis*, conforme preconizado pela ANVISA (2003). Os testes são: teste da Bile Esculina, o qual foi retirado colônias das placas em que houve o crescimento bacteriano e semeado em tubos de ensaio, contendo meio inclinado de Bile Esculina, sendo os tubos incubados a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, por 24 horas; e o teste do BHI, contendo NaCl a 6,5%, no qual também são retiradas colônias das placas em que houve o crescimento bacteriano e inoculado no respectivo meio, sendo os tubos incubados a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, por 24 horas. Após decorrido este tempo, foram realizadas as leituras. Considerou-se presença de *E. faecalis* aqueles microrganismos que apresentaram positivo no teste da Bile Esculina visualizado pela presença da mudança de coloração do meio, que de marrom claro passaria para preto; e positivo no teste do caldo de NaCl a 6,5%, visualizado se houvesse a turvação do meio.

4.11 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados do estudo de potência foi adotado o teste-t Student para comparação entre duas médias. O limite de confiança considerado foi de 95%. Sendo os dados analisados no *Microsoft Office Excel*[®] 2007.

5. RESULTADOS

5.1 *Screening* Microbiológico

Dos extratos testados, apenas os de *Schinopsis brasiliensis* e *Ximenia americana* apresentaram potencial antimicrobiano frente à cepa de *E. faecalis* (Tabela 2). Sendo assim foram selecionados apenas o extrato 03 de *S. brasiliensis* e o 01 da *X. americana* para serem submetidos ao processo de nebulização em *spray dryer* por apresentarem os maiores halos de inibição frente ao *E. faecalis* testado.

Tabela 2. Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos obtido a partir das plantas medicinais estudadas.

Extratos hidroalcoólicos	<i>C. jamacaru</i>	<i>C. campestris</i>	<i>S. mombin</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>X. americana</i>	<i>Z. reticulata</i>
Extrato 1	0,0	0,0	0,0	14,07	15,15	0,0
Extrato 2	0,0	0,0	0,0	12,28	12,27	0,0
Extrato 3	0,0	0,0	0,0	14,11	13,66	0,0
Extrato 4	0,0	0,0	0,0	12,97	12,65	0,0
Extrato 5	0,0	0,0	0,0	12,98	12,07	0,0

5.2 Estudo de Potência dos Extratos Nebulizados e da Pasta Intracanal

Os valores obtidos no estudo de potência para a *S. brasiliensis* estão expressos na Tabela 3. O diâmetro do halo obtido após o cálculo da resposta da menor dose foi de 11,37 mm, para o extrato nebulizado da *S. brasiliensis* e de 12,09 mm para a pasta a base de mesma planta. Com isso, a menor dose obtida que possui efeito significativo baseado na equação da reta da curva de calibração, representada na figura 1, foi acima de 172,58 mg para o extrato de *S. brasiliensis* frente a *E. faecalis* e de até 334,33 mg para a pasta a base da mesma planta. Enquanto que, o diâmetro do halo obtido após o cálculo da resposta da maior dose foi de 15,25 mm para o extrato nebulizado e de 15,18 mm para a pasta, os quais correspondem a uma dose de 495,92 e 677,66 mg, respectivamente.

Tabela 3. Halos de inibição obtido no estudo de potência do extrato nebulizado e da pasta formulada de *S. brasiliensis* frente a *E. faecalis*.

Dose (mg)	Halos de Inibição dos Extratos (mm)	Halos de Inibição da Pasta (mm)	Cefalotina (mm)
500	15,29	13,76	18,39
300	13,55	12,25	17,81
200	11,40	10,65	17,78
100	10,53	0,00	17,25
50	0,00	0,00	16,63

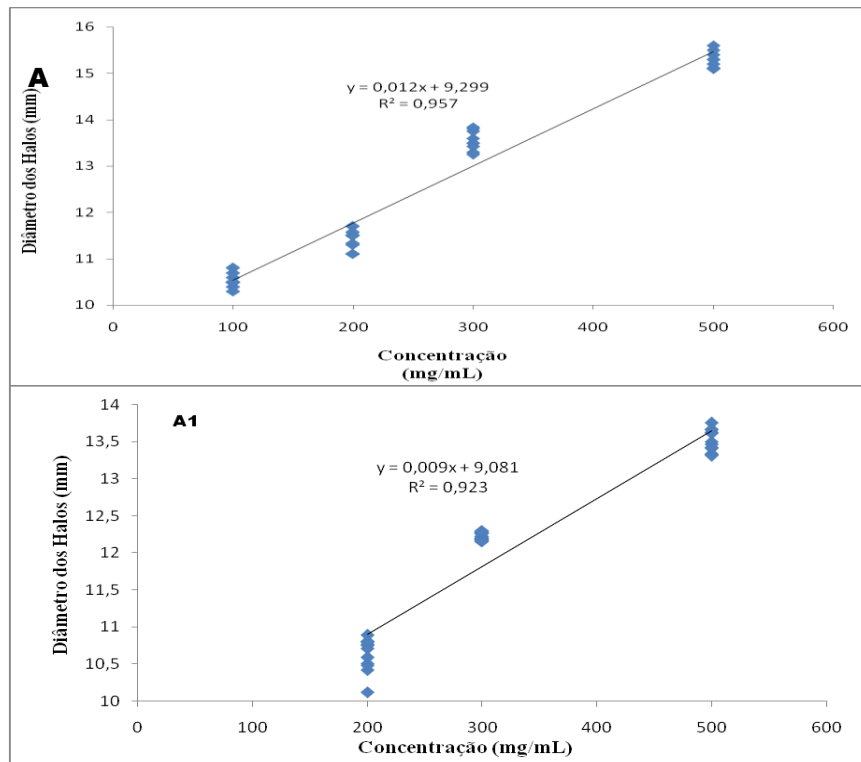
p = 0,59567

A tabela 4 mostra os halos de inibição obtido no estudo de potência do extrato nebulizado e da pasta formulada de *X. americana*. Para esta planta, a equação da reta mostrou que a dose indicada foi de 210,00 mg para o extrato nebulizado (Figura 2) e de 266,10 mg para a pasta formulada frente a *E. faecalis*. O cálculo da resposta da menor dose foi de 12,61 para o extrato nebulizado e de 12,16 para a pasta a base de *X. americana*. Enquanto, a resposta de maior dose foi de 15,69 para o extrato nebulizado e de 16,08 para a pasta, o que corresponde a uma dose eficaz de 595,00 e 658,10 mg, respectivamente.

Tabela 4. Halos de inibição obtido no estudo de potência do extrato nebulizado e da pasta formulada de *X. americana*.

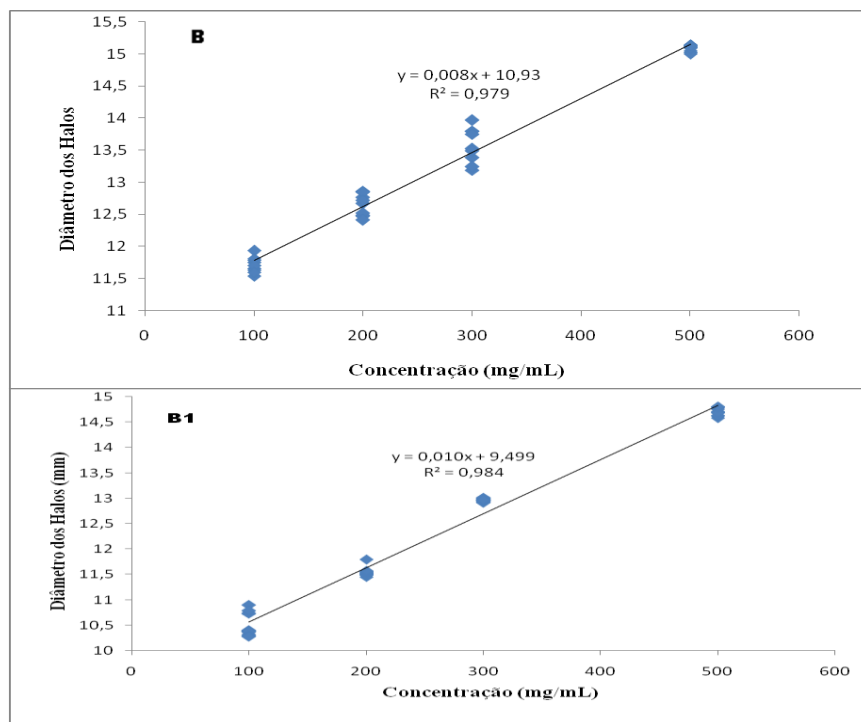
Dose (mg)	Halos de Inibição dos Extratos (mm)	Halos de Inibição da Pasta (mm)	Cefalotina (mm)
500	15,09	14,73	18,34
300	13,55	12,98	18,12
200	12,63	11,65	17,78
100	11,71	10,51	17,35
50	0,00	0,00	17,00

p = 0,46699



Legenda: y representa o valor encontrado para o halo de inibição, e o x para a dose.

Figura 1. Curva de calibração das amostras de *S. brasiliensis*: A – extrato nebulizado; A1 – pasta intracanal formulada com a mesma planta.



Legenda: y representa o valor encontrado para o halo de inibição, e o x para a dose.

Figura 2. Curva de calibração das amostras de *X. americana*: A – extrato nebulizado; A1 – pasta intracanal formulada com a mesma planta.

5.3 Eficácia sobre dentina infectada

5.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens iniciais realizadas no MEV com os dentes estéreis para controle mostram os túbulos dentinários livres de contaminação (Figura 3A e 3B). Após a décima inoculação das amostras foi observada a presença de colônias microbianas na forma de cocos na superfície dentária (Figura 3C e 3D). E, após a vigéssima inoculação foi visualizado a formação de biofilme na dentina contaminada (Figura 3E) e formação de colônias no interior dos túbulos dentinários, com a presença de obliteração desses túbulos, quando a amostra foi visualizada em maior aumento (Figura 3F).

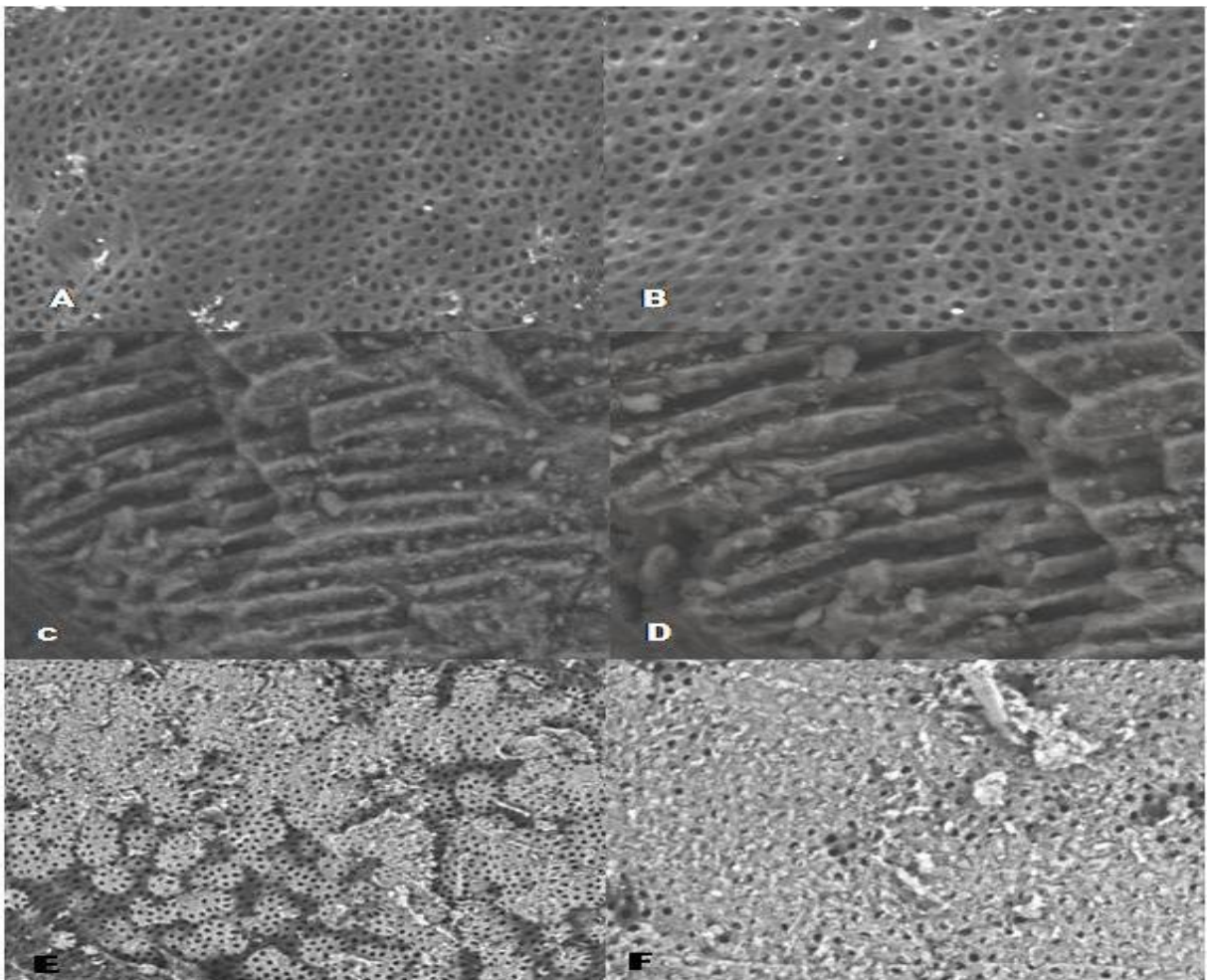


Figura 3. MEV de dente humano mostrando túbulos dentinários: A – livres de bactérias (1000x); B - livres de bactérias (2000x); C – contaminados com *E. faecalis*, com presença de colônias na superfície (2000x), após 10 inoculações; D – contaminados com *E. faecalis*, com presença de colônias (5000x), após 10 inoculações; E – contaminados com *E. faecalis*, mostrando biofilme formado na superfície da dentina e entre os túbulos dentinários (1000x), após 20 inoculações; e F – contaminado com *E. Faecalis*, mostrando biofilme formado na superfície da dentina e entre os túbulos dentinários (2000x), após 20 inoculações.

5.3.2. Microscopia Óptica (MO)

A MO realizado após 10 dias de contaminação dos túbulos dentinários mostrou a presença de colônias de *E. faecalis*, na superfície da dentina, sendo que o maior número de colônias foi observado após 20 dias de inoculação (Figura 4). As análises realizadas após a aplicação das pastas intracanal evidenciaram a contaminação e a presença de colônias em todos os grupos após a sua retirada, com 8 dias de tratamento. A pasta comercial Calen[®] apresentou visivelmente uma maior quantidade de colônias em comparação com as outras pastas (Figura 5). Enquanto que, as pastas formuladas com *X. americana* e a CTZ apresentaram uma menor quantidade de *E. faecalis*, principalmente no tempo de aplicação de 28 dias, seguida pela pasta formulada com *S. brasiliensis* (Figura 6).

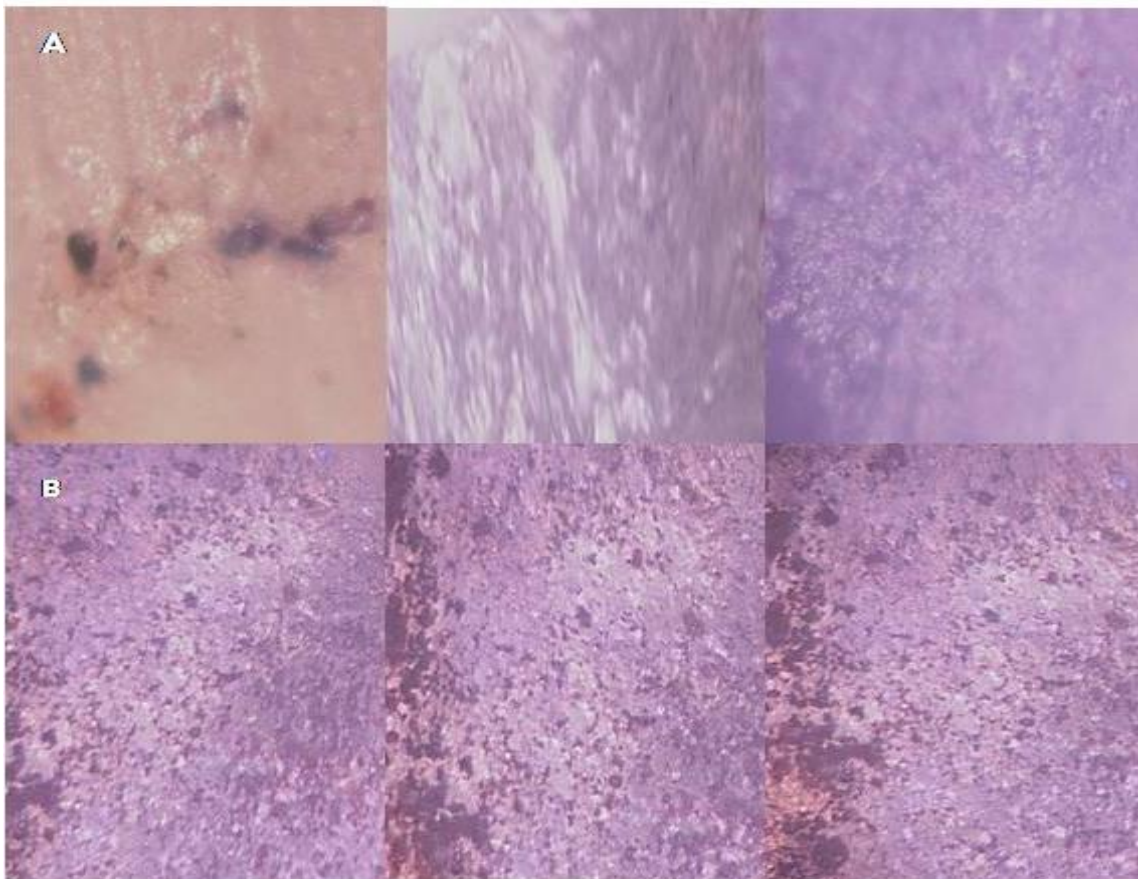


Figura 4. MO da superfície da amostra, em diferentes ângulos, após contaminação: A – imagens obtidas após o décimo dia de inoculações com *E. Faecalis*; B - imagens obtidas após o vigéssimo dia de inoculações com *E. faecalis*.

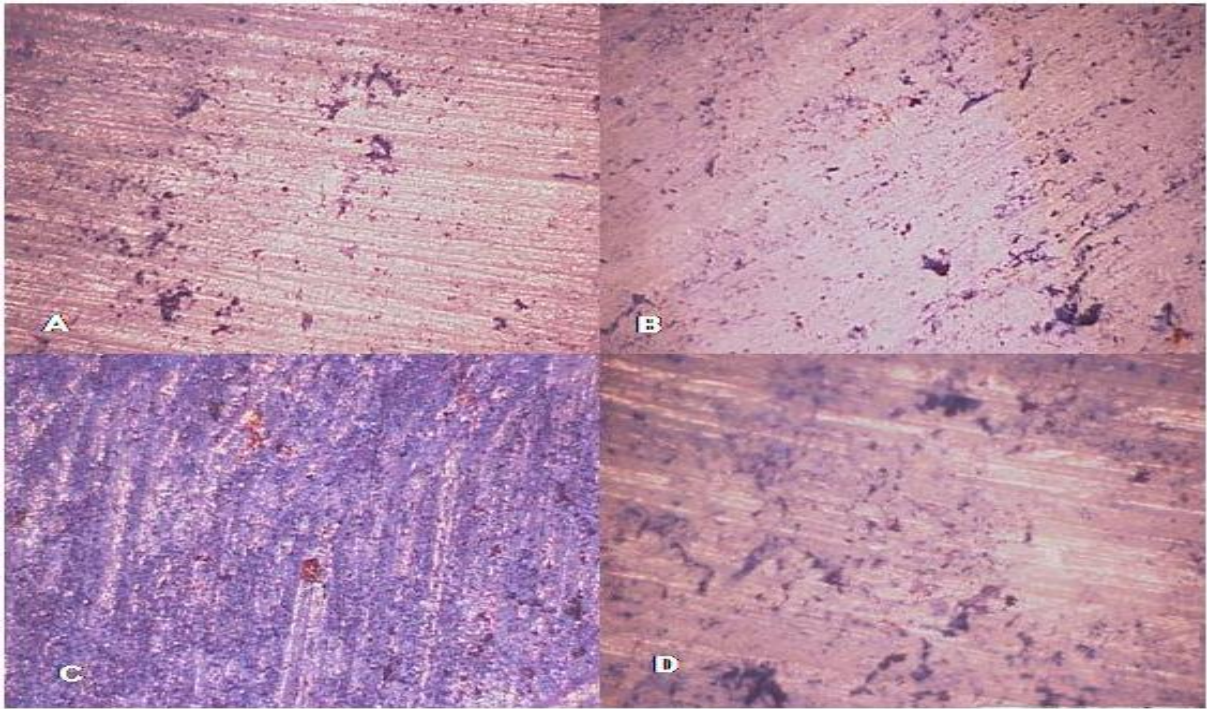


Figura 5. MO da superfície externa das amostras após o tratamento com oito dias, com as pastas experimentais: A – dente tratado com a pasta formulada com *S. brasiliensis*; B – dente tratado com a pasta formulada com *X. americana*; C – dente tratado com a pasta Calen[®]; D – dente tratado com a pasta CTZ.

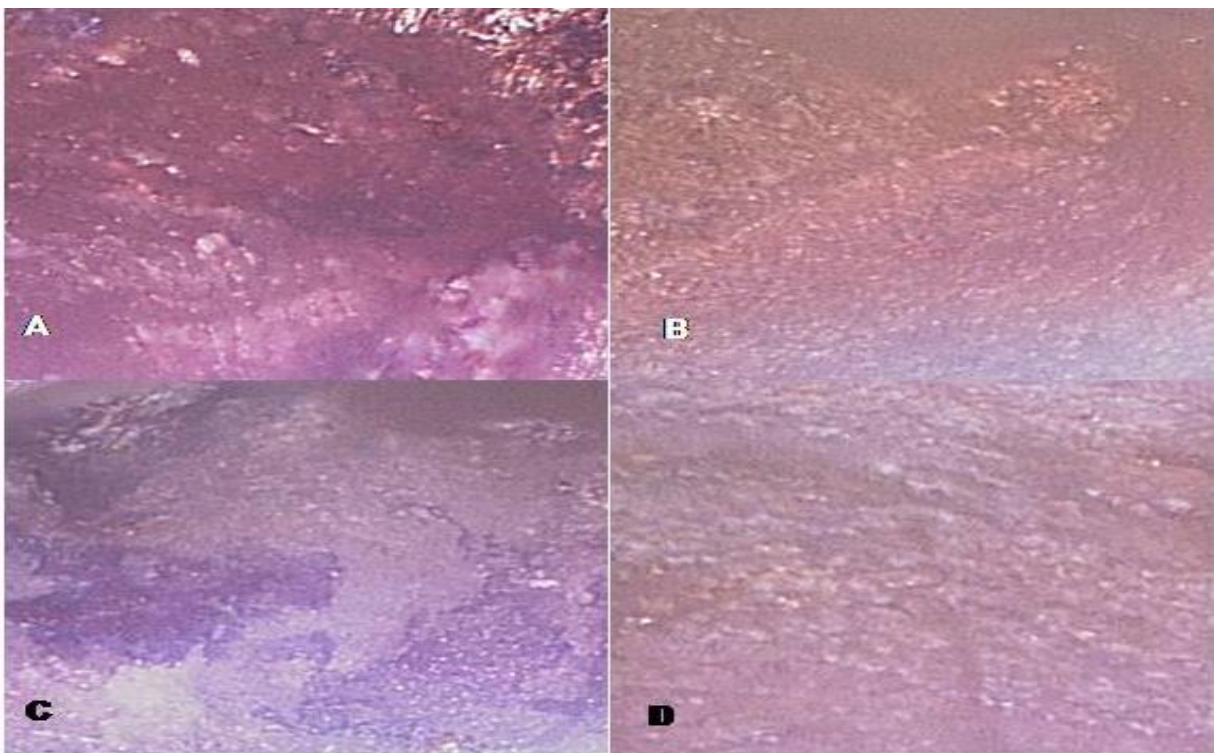


Figura 6. MO da superfície externa das amostras após o tratamento com vinte e oito dias, com as pastas experimentais: A – dente tratado com a pasta formulada com *S. brasiliensis*; B – dente tratado com a pasta formulada com *X. americana*; C - dente tratado com a pasta Calen[®]; D - dente tratado com a pasta CTZ.

5.3.3. Ensaio de confirmação da ausência ou presença de *E. Faecalis* após a aplicação das pastas intracanal

Para essa confirmação, após serem removidas as pastas, os dentes foram lavados com solução salina estéril e imersos em tubos de ensaio contendo caldo BHI estéril, com a finalidade de se visualizar a turbidez do meio utilizado. Nas amostras do período de 8 apenas a pasta CTZ obteve resultado satisfatório. Entretanto, no segundo teste realizado com 28 dias, a pasta formulada com *X. americana* apresentou resultados promissores, que não foi observado na pasta formulada com *S. brasiliensis* devido a presença de turbidez (Figura 7). Após a observação da turbidez dos meios foram realizados os testes de identificação presuntiva do *E. faecalis*, nas pastas estudadas. Esses testes foram realizado pelo método da Bile Esculina e do caldo BHI. Os resultados mostraram e confirmaram que houve a presença de *E. faecalis* apenas nos dentes contendo as pastas com *S. brasiliensis* e com Calen[®]. Não sendo observado e nem confirmado a presença desta bactéria nos dentes contendo a pasta formulada com *X. americana* L. (Figura 8).

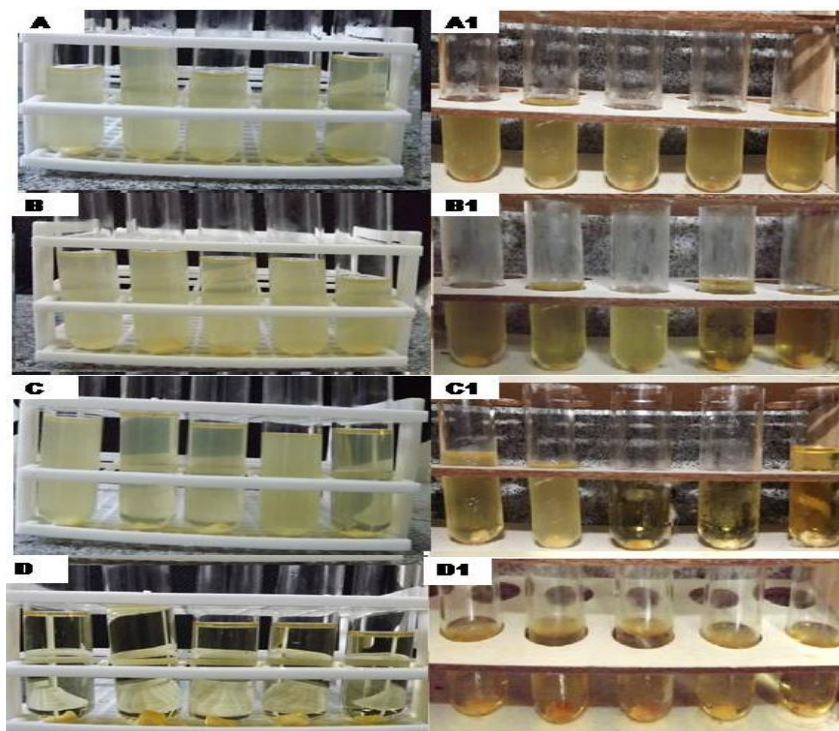


Figura 7. Ensaio de verificação de turvação em todos os grupos estudados, respectivamente: A – *S. brasiliensis* (8 dias), A1 – *S. brasiliensis* (28 dias); B – *X. americana* (8 dias); B1 – *X. americana* (28 dias); C – Calen[®] (8 dias), C1 – Calen[®] (28 dias); D – CTZ (8 dias), D1 – CTZ (28 dias).

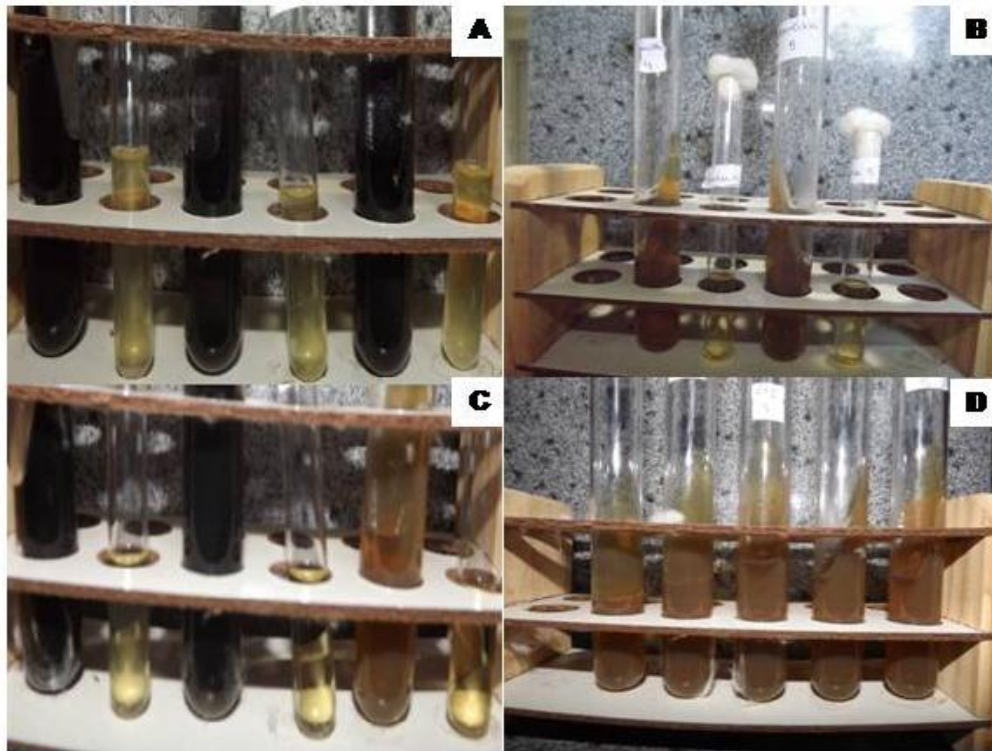


Figura 8. Ensaio realizado pelo método da Bile Esculina e do caldo BHI, contendo 6,5 % de NaCl, nas pastas: A - formulada com *S. brasiliensis*; B – formulada com *X. americana*; C - Calen[®]; D - CTZ.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de pesquisas laboratoriais com diferentes microrganismos possibilita um avanço nas investigações científicas e no combate das infecções causadas pelos mesmos, possibilitando a criação de novos medicamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos. A resistência ocasionada devido ao uso descontrolado de antimicrobianos justifica pesquisas por novas drogas, sejam elas de origem sintéticas ou naturais.

As plantas utilizadas neste estudo possuem poucas referências na literatura acerca da sua atividade frente às bactérias da cavidade oral. Saraiva et al. (2011) avaliando o extrato metanólico de *S. brasiliensis*, Koné et al. (2004) e Costa et al. (2011) avaliando extratos de *X. americana* e Silva et al. (2012) avaliando extratos das duas plantas encontraram resultados positivos frente a cepas do *E. faecalis*, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

O modelo experimental utilizado neste estudo foi adaptado do modelo utilizado por Rezende et al. (2011), com a utilização de raízes palatinas de dentes humanos superiores permanentes e o inóculo bacteriano foi padronizado em espectrofotômetro, ao contrário dos autores citados que utilizaram dentes decíduos e o inóculo foi padronizado pela escala de McFarland. O procedimento para contaminação da dentina neste estudo está de acordo com os resultados encontrados na literatura, em experimentos que utilizaram metodologias semelhantes (AWAWDEH et al., 2009; MOHAMMADI, SHAHRIARI, 2008). O método utilizado visa reproduzir situações encontradas na clínica, e a contaminação da dentina por *E. faecalis* durante 60 dias permite que a bactéria penetre nos túbulos dentinários para formar um biofilme. Clinicamente a penetração destes túbulos está relacionada ao tempo de incubação, aumentando a invasão quando o tempo também é aumentado (REZENDE et al., 2011). O tempo para remoção da pasta também foi baseado em estudos *in vitro*, utilizando o hidróxido de cálcio, encontrados na literatura, que normalmente apresentam variações entre uma semana e um mês (JAVIDI et al., 2011; REZENDE et al., 2011). O presente estudo foi realizado em dois períodos de avaliação para que a medicação fitoterápica tivesse tempo suficiente de agir nas amostras estudadas.

O microrganismo escolhido para a inoculação foi o *E. faecalis* devido à sua reconhecida patogenicidade e resistência ao tratamento endodôntico. Diversos estudos nessa área utilizam o *E. faecalis* como microrganismo de escolha para experimentos *in vitro*, pois

além do mesmo apresentar resistência ao hidróxido de cálcio, também possui cepa de fácil manipulação e cultivo (REZENDE et al., 2011; COSTA et al., 2010; OZDEMIR et al., 2010; AWAWDEH et al., 2009; MOHAMMADI e SHAHRIARI, 2008).

A determinação de concentrações terapêuticas com a capacidade de matar ou inibir o crescimento bacteriano é necessário para que seja administrada uma dose correta do antimicrobiano (ESMERINO et al., 2004). O modelo utilizado neste estudo foi adaptado da Farmacopéia Brasileira V ed. (2010), a qual preconiza que se deve determinar a potência ou atividade de um produto contendo antibiótico, comparando a dose que inibe o crescimento de um microrganismo susceptível em relação à dose de uma substância padrão que produz inibição similar. Esse método é amplamente aplicado pelas indústrias farmacêuticas no estudo de potência e no controle da qualidade de medicamentos contendo antimicrobianos.

A determinação da potência dos antimicrobianos é importante no controle e na garantia da qualidade das preparações farmacêuticas e faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados no doseamento desses fármacos (LOURENÇO, PINTO, 2009). Esse doseamento geralmente é feito comparando-se a dose com a qual se inibe o crescimento de um microrganismo adequado e susceptível com a dose da preparação do antibiótico de referência nas mesmas condições de trabalho (UNITED STATES PHARMACOPEIAL 30/ NF 25, 2007).

Dessa forma, este estudo pretendeu aplicar este modelo, pois segundo PINTO et al. (2010), o ensaio microbiológico para determinação da potência dos antibióticos é indicado também para substâncias ou preparações cujo teor não pode ser definido por métodos físico-químicos, como produtos de origem natural que podem conter misturas de substâncias. Essa potência pode ser demonstrada sob condições adequadas através de seu efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, utilizando um microrganismo como revelador.

Assim, observou-se que nos extratos nebulizados estudados o coeficiente de correlação (r^2) ficou próximo da unidade ($r^2 = 1$). Os resultados obtidos mostraram uma possível linearidade do método aplicado e dos resultados obtidos, indicando que a variação dos diâmetros dos halos de inibição foi proporcional ao aumento da dose da substância, e mostrando uma eficácia maior da *X. americana* $r^2 = 0,979$ (extrato) e $r^2 = 0,984$ (pasta), quando comparados a *S. brasiliensis* $r^2 = 0,957$ (extrato) e $r^2 = 0,923$ (pasta).

Alguns estudos são encontrados na literatura acerca do estudo de potência, mas apenas para fármaco sintético, como o de Esmerino et. al. (2004), o qual determinou a potência de

três antimicrobianos: cefalexina, ciprofloxacina e eritromicina. Para o ensaio com a cefalexina e ciprofloxacina utilizaram-se o *Staphylococcus aureus*, como microrganismo-teste e as curvas obtidas apresentaram coeficiente de correlação próximo da unidade com $r^2=0,9754$ e $r^2=0,9885$, respectivamente. No teste para eritromicina utilizou-se *Micrococcus luteus*, obtendo-se coeficiente de correlação $r^2 = 0,9907$. Para todos os antimicrobianos, os coeficientes de variação obtidos com os diâmetros dos halos de inibição ficaram abaixo de 5% indicando adequada precisão. Farago et al. (2006), que determinou a potência da amoxicilina em suspensões orais, usando como microrganismo-teste, *Staphylococcus aureus*. Analisaram-se três suspensões comerciais de amoxicilina (referência, similar e genérico) com potência declarada de 250 mg/5mL. Soluções de 20 µg/mL, preparadas com as suspensões, apresentaram halos de inibição com médias (n=5) de 25,33; 25,33 e 25,17 mm. As concentrações determinadas foram de 251,6; 251,6 e 244,74 mg/5mL, o que corresponde a 100,6; 100,6 e 97,74% da potência declarada de amoxicilina, respectivamente. Concluiu-se que as amostras analisadas estavam dentro dos limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira. A partir dos resultados obtidos, observou-se que o método microbiológico de cilindros em placas é adequado e válido para o doseamento da potência da amoxicilina em suspensões orais.

A associação dos extratos nebulizados da *X. americana* e da *S. brasiliensis* com o hidróxido de cálcio realizado neste estudo objetivou a formação de uma pasta que visa a eliminação de *E. faecalis*. A pasta baseada em *S. brasiliensis* não apresentou atividade contra as cepas de *E. faecalis* em nenhum dos momentos estudados, apesar do extrato hidroalcoólico e do extrato nebulizado da referida planta possuírem ação antimicrobiana. Este achado pode indicar que o hidróxido de cálcio influenciou nas propriedades antimicrobianas da *S. brasiliensis*. Em relação ao hidróxido de cálcio, os resultados mostraram que a pasta Calen[®] não foi capaz de erradicar o *E. faecalis*, concordando com resultados encontrados na literatura (JAVIDI et al., 2011; REZENDE et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011).

A pasta CTZ apresentou atividade nos dois tempos estudados, devido a presença de antibióticos de amplo espectro de ação, a pasta possuiu atividade mesmo no menor tempo estudado (8 dias), obtendo os melhores resultados em todos os testes realizados, quando comparados as pastas experimentais e a Calen[®]. A pasta a base da *X. americana* apresentou atividade contra as cepas de *E. faecalis* apenas no segundo tempo estudado (28 dias). Devido à formação de biofilme pelas cepas de *E. faecalis*, o fitocomplexo presente na pasta a base da

X. americana possivelmente necessitou de um tempo maior para a eliminação do microrganismo.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados nesta pesquisa, podemos afirmar que:

- As doses indicadas para os extratos nebulizados foram menores que as indicadas para a pasta formulada;
- O extrato nebulizado da *S. brasiliensis* apresentou o maior halo de inibição na concentração de 500mg, entretanto a pasta que apresentou o maior halo de inibição foi à baseada em *X. americana*;
- Foi observada presença de colônias do *E. faecalis* em todas as análises de microscopia óptica, contudo, houve pequena presença de colônias na análise da amostra com CTZ;
- A pasta baseada em *X. americana* obteve sucesso na eliminação do *E. faecalis* em 28 dias;
- A pasta Calen[®] e a formulada com *S. brasiliensis* não foram capazes de eliminar o *E. faecalis* em todas as amostras.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–95, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil, **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 30, p. 1–10, 2006.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–54, 2007.

AMORIM, L. F. G.; TOLEDO, O. A.; ESTRELA, C. R. A.; DECURCIO, D. A.; ESTRELA, C. Antimicrobial Analysis of Different Root Canal Filling Pastes Used in Pediatric Dentistry by Two Experimental Methods. **Braz. Dent. J.**, v. 17, n. 4, p. 317-22, 2006.

AN, S.; GAO, Y.; LING, J.; WEI, X.; XIAO, Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 23, p. 789-95, 2012.

AWAWDEH, L.; AL-BEITAWI, M.; HAMMAD, M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. **Aust. Endod. J.**, v. 35, n. 52-8, 2009.

BASRANI, B.; GHANEM, A.; TJA'DERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J. Endod.**, v. 20, n.6, p. 413-17, 2004.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Legislação. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASILEIRO, M. T. et al. *Ximenia americana L.*: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.

CAMARGO, C. H. R.; AFONSO, S. E.; VALERA, M. C.; MANCINI, M. N. G.; BERNARDINELLI, N.; OLIVEIRA, L. D. Avaliação do pH e liberação de íons cálcio, na utilização intracanal de pastas à base de hidróxido de cálcio. **Cienc. Odontol. Bras.**, v. 6, n. 1, p. 51-9, 2003.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, n. 71, p. 58, 2000.

CAPPIELO, J. Tratamientos pulpares em incisivos primarios. **Rev Asoc Odontol Argent**, v. 52, n. 4, p. 139-150, 1964.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement**. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.

COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A.; et al. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175–80, 2010.

COSTA, E. M. M. B. et al. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2011.

CUNHA, C.B.C.S.; BARCELOSS, R.; PRIMO, L.G.; Soluções irrigadoras e Materiais Obturadores Utilizados na Terapia Endodôntica de Dentes Decíduos. **Pesq. Bras. Odontoped Clin. Integr**, v. 5, n. 1, p. 75-83, 2005.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agentes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174–81, 2012.

DAMASCENO, M. M.; SOUTO, J. S.; SOUTO, P. C. Etnoconhecimento de espécies forrageiras no semi-árido da Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 7, n. 3, p. 219-28, 2010.

DANTAS, I. C. **O raizeiro e suas raízes: um novo olhar sobre o saber popular**. Campina Grande, Universidade Estadual da Paraíba, Dissertação de Mestrado em Saúde Coletiva, 2002. 134 f.

DELGADO, R. J. R. et al. Antimicrobial Effects of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **JOE**, v. 36, n. 8, 2010.

DISTEL, J. W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**, v. 28, p. 689–93, 2002.

DOMINGUES, A. R.; MUNOZ, L. M.; AZNAR, T. M. Study of calcium hydroxide apexification in 26 young permanent incisors. **Dental Traumatology**, v. 21, p. 141-5, 2005.

DOTTO, S. R.; TRAVASSOS, R. M. C.; FERREIRA, R. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. **Revisto Odonto Ciência**, v. 21, n. 53, p. 266-69, 2006.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; SCHELESKY, M. E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2004.

ESTRELA, C; SYDNEY, G.B.; BAMMANN, L.L. et al., Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática das bactérias anaeróbicas. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v. 2, n. 4, p. 31-38, 1994.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BAMMANN, L. L.; FELIPPE JÚNIOR, O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**, v. 6, p. 85–90, 1995.

ESTRELA, C.; PÉCOR, J.D.; SOUZA-NETO, M.D.; ESTRELA, C. R. A.; BAMMANN, L.

L. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide paste. **Braz Dent J**, v. 10, p. 63-72, 1999.

ESTRELA, C.; HOLLAND R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 11, n. 4, p. 269-82, 2003.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; DECURCIO, D.A.; HOLLANDA, A. C. B.; SILVA, J. A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Int Endod J.**, v. 40, n. 2, p. 85-93, 2007.

FARAGO, P. V.; ESMERINO, L. A.; PAULA, J. P.; JACOB, J. S.; SERVAT, L. Método Microbiológico para o Doseamento da Potência da Amoxicilina em Suspensões Oraís. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 112-6, 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-57, 2009.

FULZELE, P.; BALIGA, S.; THOSAR, N.; PRADHAN, D. Evaluation of calcium ion, hydroxyl ion release and pH levels in various calcium hydroxide based intracanal medicaments: An *in vitro* study. **Contemp Clin Dent.**, v. 2, n. 4, p. 291–295, 2011.

GEIJERSSTAM, A. H. R.; ELLINGTON, M. W.; WOODFORD, N.; HAAPASALO, M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. **Oral Microbiol Immunol.** v. 21, p. 164-8, 2006.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 31, p. 867–72, 2005.

GIL, E. S.; BRANDÃO, A. L. A. **Excipientes: suas aplicações e controle físico-químico.** 2ª Ed. Pharmabooks, São Paulo, 2007.

GONZÁLEZ-NÚÑEZ, D.; TREJO-QUIROZ, P.; DE LEÓN-TORRES, C., CARMONA-RUIZ, D. Non instrumented endodontic technique using CTZ paste. **Rev. Estomat.**, v. 18, n. 2, p. 27-32, 2010.

HAAPASALO, M. P. P.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J. Dent. Res.**, v. 66, p. 1375-79, 1987.

HUBBLE, T. S.; HATTON, J. F.; NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E.; GILLESPIE, M. J. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 18, p. 121-6, 2003.

JAMES, D. B. et al. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. Paquistão, **Journal of Medical Science.** v. 7, n. 2, p. 284-8. 2007.

JAVIDI, M.; ZAREI, M.; AFKHAMI, F. Antibacterial effect of calcium hydroxide on intraluminal and intratubular *Enterococcus faecalis*. **Iranian Endodontic Journal**, v. 6, n. 3, p. 103-6, 2011.

KANUMURU, N. R.; BOLLA, N.; KUMAR, R.; KULANDAIVELU, A. Evaluation of the bactericidal effect of Nd: YAG Laser on *Enterococcus faecalis* versus Calcium Hydroxide in the root canal system – An *in vitro* study. **JIDA**, v. 6, n. 2, 2012.

KONÉ, W. M. et al. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Cagliari, v. 93, p. 43–49. 2004.

KRAMER, P. F.; FARACO JÚNIOR, I. F.; FELDENS C. A. Estado Atual da Terapia Pulpar nas Universidades Brasileiras Pulpotomia e Pulpectomia em Dentes Decíduos. **J. Bras. Odontop. Odontol. Bebe**, v.3, n.3, p. 222-230, 2000.

LEONARDI, D. P.; BATTISTI, J. C.; KLIMIONT, D. T; TOMAZINHO, P. H.; BARATTO FILHO, F.; HARAGUSHIKU, G. A.; TOMAZINHO, F. S. F. Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 4, p. 367-373, 2009.

LIMA, R. K. P.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; FARIA-JÚNIOR, N. B.; TANOMARU-FILHO, M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 45, p. 311–6, 2012.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure.

International Endodontic Journal, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. J. A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 3, 2009.

MADHUBALA, M. M.; SRINIVASAN, N.; AHAMED, S. Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*. **JOE**, v. 37, n. 9, 2011.

MATOS, J. M. D. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Fortaleza: [s. n.], 1987.

MATTOS, E. C. G.; CHAIN, M. C.; SANTOS, A. R. S.; TRAMONTE, R.; RODRIGUES FILHO, R. Biological compatibility of the endodontic paste prepared with tetracycline, thiamphenicol and zinc oxide implanted on the subcutaneous tissue of rats. **In. j. odontostomatol. (Print)**, v. 2, n. 1, p. 7-16, jul 2008.

MEVY, J. P. et al. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana L.* **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, p. 549-553, 2006.

MITTAL, N.; JAIN, J. Antibiotics as an intracanal medicament in endodontics: A review. **Indian Journal of Dentistry**, 2012.

MOHAMMADI, Z.; SHAHRIARI, S. Residual antibacterial activity of chlorhexidine and MTAD in human root dentin *in vitro*. **Journal of Oral Science**, v. 50, n. 1, p. 63-7, 2008.

MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, p. 1-7, 1998.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, n. 2, p. 5-8, 2003.

OGUNLEY, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia Americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 239–41, 2003.

OLIVEIRA, E. P. M.; IRALA, L. E. D.; SANTOS, A. R.; MELO, T. A. F. Avaliação da ação antimicrobiana de quatro formulações a base de hidróxido de cálcio utilizadas como medicação intracanal. **RFO**, v. 15, n. 1, p. 35-39, 2010.

OLIVEIRA, M., COSTA, L. Desempenho clínico de pulpotomias com pasta CTZ em molares decíduos: estudo retrospectivo. **Revista Odontológica do Brasil-Central**, v. 15, n. 40, 2010.

OLSEN, R. H.; SCHØNHEYDER, H. C.; CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. *Enterococcus faecalis* of Human and Poultry Origin Share Virulence Genes Supporting the Zoonotic Potential of *E. faecalis*. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. 4, p. 256-63, 2012.

OMER, M. E. F. A.; ELNIMA, E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**. v. 74, p.122-6, 2003.

OZDEMIR, H. O.; BUZOGLU, H. D.; CALT, S.; STABHOLZ, A.; STEINBERG, D. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: *in vitro* study. **JOE**, v. 36, n. 5, p. 842-6, 2010.

PADILLA, C. E.; NUNEZ, M. A.; PADILLA, A. G.; LOBOS, O. G. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. **Rev. chil. infectol. [online]**, v. 29, n. 1, p. 55-61, 2012.

PANZARINI, S. R.; TREVISAN, C. L.; BRANDINI, D. A.; POI, W. R.; SONODA, C. K.; LUVIZUTO, E. R.; SANTOS, C. L. V. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. **Dental Traumatology**, v. 28, p. 42-8, 2012.

PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol. 2000**, v. 42, p. 80-87, 2006.

PAVASKAR, R. et al. An *in vitro* study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide – and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis*. **JOE**, v. 38, n. 1,

2012.

PECORARO, P. V. B. F.; REIS JR., F. T. Avaliação crítica da pasta CTZ na Endodontia de Decíduos, uma real alternativa? **Revista de Faculdade de Odontologia de Valença**, v. 4, p. 5-6, 1999.

PÉCOUL, B.; CHIRAC, P.; TROUILLER, P.; PINEL, J. Access to Essential Drugs in Poor Countries. A Lost Battle? **JAMA**, v. 281, n. 4, p. 361–367, 1999.

PEREIRA, E. M. R.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R.; AGUIAR, E. G.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS, V. R. *In vitro* Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. **Planta Med**, v. 77, n. 4, p. 401-4, 2011.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUSA, E. L. R.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 1-11, 2003a.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; TEIXEIRA, F. B.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 18, p. 100–103, 2003b.

PINHEIRO, E.T.; GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v. 37, n. 756, 2004.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 780 p.

PIVA, F.; FARACO JUNIOR, I. M.; FELDENS, C. A.; ESTRELA, C. R. A. Ação antimicrobiana de materiais empregados na obturação dos canais de dentes decíduos por meio da difusão em ágar: Estudo *in vitro*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 9, n. 1, p. 13-7, 2009.

RAMOS, I. F. A. S et al. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an in vivo study. **J.**

Appl. Oral Sci., Bauru, v. 20, n. 1, 2012.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

REZENDE, G. P. S. R.; DECURCIO, D. A.; ESTRELA, C; COSTA, L. R. R. S. Antibacterial action of intracanal medicaments on infected dentin of deciduous and permanent teeth. **Dental Press Endod.**, v. 1, n. 2, p. 28-33, 2011.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA J. R. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. **J Endod.**, v. 34, p. 1249-54, 2008.

ROSEMBERG, B.; MURRAY, P. E.; NAMEROW, K. The effect of calcium hydroxide root filling on dentin fracture strength. **Dental Traumatology**, v. 23, p. 26-9, 2007.

SACANDE, M.; VAUTIER, H. *Ximania americana* L. **Forest & Landse Denm.** v. 112, p. 1-2, 2006.

SADHASIVAM, S.; CHEN, J. C.; SAVITHA, S.; HSU, M. X.; HSU, C. K.; LIN, C. P.; LIN, F. H. Synthesis of partial stabilized cement–gypsum as new dental retrograde filling material. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 1859–67, 2012.

SAKAMOTO, M.; SIQUEIRA JR., J. F.; RÔÇAS, I. N.; BENNO, Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 1, p. 19-23, 2007.

SALAH, R.; DAR-ODEH, N.; HAMMAD, O. A.; SHEHABI, A. A. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. **BMC Oral Health**, v. 8, n. 17, 2008.

SARAIVA, A. M. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes.** Recife, Universidade Federal de Pernambuco, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, 184 f.

SARAIVA, A. M. et al. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity

properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724-31, 2011.

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

SILVA, M. S. P. **Ensaio Pré-Clínicos com Extratos de Plantas Medicinais do Semi-árido Nordeste. Contribuição para o Tratamento de Infecções da Cavidade Bucal**, Campina Grande, Universidade Estadual da Paraíba, Dissertação de Mestrado em Odontologia Clínica, 2011. 81 f.

SILVA, M. S. P.; et al. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

SILVEIRA, C. F. M. et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. **European Journal of Dentistry**, v. 5, p. 1-7, 2011.

SIMÕES, O. M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. p. 14-15.

SIQUEIRA, C. F. Q.; CABRAL, D. L. V.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al., Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

SOLANKI, G. RECENT ADVANCEMENT IN ROOT CANAL TREATMENT. **International Journal of Biomedical Research**, v.3, n.1, p. 15-23, 2012.

SONODA, C. K.; POI, W. R.; PANZARINI, S. R.; OKAMOTO, T. B.; PAULA, A. L. Influence of calcium hydroxide paste in mediate teeth replantation. Study in rats. **Rev Bras Odontol**, v. 59, p. 236-40, 2002.

TAVARES, W. L. F.; NEVES DE BRITO, L. C.; TELES, R. P.; MASSARA, M. L. A.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; TELES, F. R.

Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA–DNA hybridization. **International Endodontic Journal**, v. 44, p. 225–235, 2011.

TOMAZINHO, L. F.; SILVA, D. C. C.; FAGUNDES, F. S.; TOMAZINHO, P. H. Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras na eliminação de *Enterococcus faecalis*. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 4, n. 1, p. 12-16, 2007.

TURK, B. T.; SEN, B. H, OZTURK T. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, p. 297-301, 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – **The National Formulary – 30th edition, NF 25**, Rockville: The United States, Pharmacopeial Convention, 2007.

VIDANA, R.; SULLIVAN, Å.; BILLSTRÖM, H.; AHLQUIST, M.; LUND, B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals – host-derived or exogenous source?. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 109–115, 2010.

VOSS, C.; EYOL, E.; BERGER, M. R. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 177 – 87, 2006.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of Biofilm Formation and gelE Gene Expression in *Enterococcus faecalis* Recovered from Root Canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. **JOE**, v. 37, n. 5, p. 631-36, 2011.

WATERS, C. M.; ANTIPOORTA, M. H.; MURRAY, B. E.; DUNNY, G. M. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **J Bacteriol**, v. 185, p. 3613-23, 2003.

ZENDER, M.; GUGGENHEIM, B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. **Int Endod Journal**, v. 42, n. 4, p. 277-87, 2009.

APÊNDICE 1 – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para a doação de dentes, consultório particular.

..... (nome), cirurgião-
dentista inscrito no CRO sob o nº, com consultório no endereço:
.....
.....vem
por meio e na melhor forma de direito

DOAR

para o CD Amaro Lafayette Nobre Formiga Filho, para fins da pesquisa “AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICÁCIA DE DUAS PASTAS INTRACANAL DESENVOLVIDAS A PARTIR DE PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO”,
(quantidade e tipo de dentes), declarando, sob as penas da lei, que os dentes objeto da presente doação foram extraídos por indicação terapêutica, cujos históricos circunstanciados fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam, e que se encontram arquivados sob a minha responsabilidade.

Data: / /

Cirurgião –Dentista: _____
C.R.O. : _____

Assinatura

Testemunha

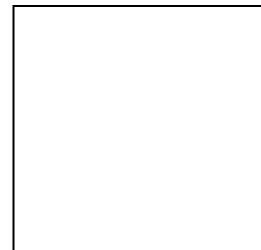
APÊNDICE 2 – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para a doação de dentes, paciente.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
 natural de _____, sexo _____, raça _____,
 residente à _____ nº _____,
 telefone _____ RG nº _____,
 aceito doar o(s) dente(s) _____ para o CD Amaro
 Lafayette Nobre Formiga Filho, para fins da pesquisa “AVALIAÇÃO IN VITRO DA
 EFICÁCIA DE DUAS PASTAS INTRACANAL DESENVOLVIDAS A PARTIR DE
 PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO”. Estou consciente de que este(s) dente(s) foi
 (foram) extraído(s) por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como
 documentado em meu prontuário. Esta pesquisa é aprovada pelo Comitê de Ética em
 Pesquisa, sendo preservada a minha identidade na divulgação.

_____, _____ de _____ de _____

 Assinatura do Doador ou Responsável



 Assinatura

 Testemunha