

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA  
*ANNONA CRASSIFLORA* MART. FRENTE A  
MICROORGANISMOS DA MICROFLORA ENDODÔNTICA**

.

**Amaro de Mendonça Cavalcante**

**Maceió, Maio de 2008**



**Universidade Federal de Alagoas**  
**Centro de Ciências Exatas e Naturais**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA (IQB)**  
**Curso de Pós-graduação em Química e Biotecnologia**



**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA *ANNONA*  
*CRASSIFLORA* MART. FRENTE A MICRORGANISMOS  
DA MICROFLORA ENDODÔNTICA**

**AMARO DE MENDONÇA CAVALCANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Doutor em Química e Biotecnologia.

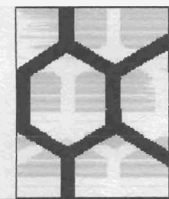
**Orientador: Dr. Antônio Euzébio  
Goulart Sant'Ana**

Maceió, maio de 2008

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

- C376a Cavalcante, Amaro de Mendonça.  
Avaliação antimicrobiana da *Annona crassiflora* Mart. Frente a microorganismos da microflora endodôntica / Amaro de Mendonça Cavalcante, 2008.  
xii, 136 f. : il. tabs., grafs.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2008.
- Bibliografia: f. [102]-115.  
Anexos: f. [116]-136.
1. *Annona crassiflora* – Biotecnologia. 2. *Annona crassiflora* – Atividade antimicrobiana. 3. Microflora endodôntica. 4. Endodontia. I. Título.

CDU: 57.08:616.314.16/.18




**PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

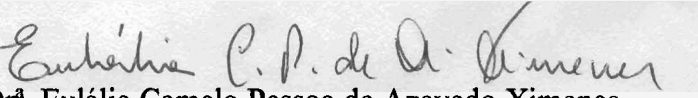
Instituto de Química e Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas  
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389  
www.cpgqb@qui.ufal.br

Campus A. C. Simões  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970  
Maceió-AL  
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Amaro de Mendonça Cavalcante intitulada: "Avaliação da Atividade da *Annona Crassiflora* Mart. Frente a Microrganismos da Microflora Endodôntica," apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 23 de maio de 2008, às 9hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.


COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

  
Prof. Dr. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes  
Depto. de Antibióticos/UFPE

Prof. Dr. José Ivo Limreira dos  
Faculdade de Odontologia FOUFAL//UFAL

  
Prof. Dr. Carlos Alberto De Simone  
PPGQB/IQB/UFAL

  
Charles dos Santos Estevam  
CCS/UFS

## DEDICATÓRIA

*O que contamina o homem, não é o que entra pela boca mas o que sai da boca do homem, porque procede do coração (JESUS CRISTO).*

A minha inesquecível mãe querida, Maria Bertilde C. A. de Araújo (in memoriam), pelo exemplo de caráter e de religiosidade, fundamental na formação de minha personalidade.

## **AGRADECIMENTOS**

A Jesus Cristo, este santo homem, filho de Deus, que após 2008 anos nos faz acreditar ser a fé, a maior das ciências. Obrigado SENHOR, por tudo que tens feito por mim em todas as horas da minha vida, sem ti nada eu seria e nada realizaria.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana e a co-orientadora Profa. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, pela paciência, dedicação e bondade na transmissão dos ensinamentos para elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Bento e seu grupo de pesquisa do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do IQB, pela valiosa contribuição.

Ao Prof. Silvio Torres pela valorosa contribuição na análise estatística dos resultados.

Aos Profs. Drs. João Xavier e Charles Estevão pela colaboração valiosa na parte experimental.

Aos meus familiares e amigos, especialmente minha esposa, filhas, genros e neta pelo apoio e compreensão ao longo desta jornada.

Aos amigos-irmãos feitos ao longo desta caminhada, Amaro Carlos, Cícero Alexandre, Karlos Lisboa, José Carlos, Marcos Jorge, Almir Mirapalheta, Ginaldo Junior e Cenira Carvalho pelo apoio em todas as horas.

A todos os colegas do laboratório de Produtos Naturais do IQB pelos momentos de cooperação mútua que só nos fez crescer.

A todos os professores do IQB, pela delicadeza e amabilidade a mim dedicada ao longo desses 05 anos.

Aos funcionários do laboratório de produtos naturais do IQB, Audi e Margarida pela gentileza bondade e desprendimento em todos os momentos que necessitamos dos seus préstimos.

A todos os funcionários das Secretarias de Graduação e Pós-graduação do IQB pela presteza de todas as horas.

A todos os funcionários da secretaria da FOUFAL, pelo desprendimento em todos os momentos.

Aos irmãos, Profs. Drs. José Ivo Limeira e Lucineide Melo pelo incentivo e apoio em todos os instantes.

Ao amigo, Prof. Dr. Comendador Hilário Alencar pelo apoio dado do início ao término deste trabalho.

A todos os meus ex-professores da FOUFAL responsáveis pelo início de minha vida acadêmica.

Enfim, a todos que dirigem a FOUFAL e a UFAL por acreditarem e serem responsáveis diretos pela minha liberação no período 2003-2008, para concretização deste objetivo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1 A família Annonaceae	15
2.2. O Gênero <i>Annona</i>	15
2.3 A espécie <i>Annona crassiflora</i> Mart	15
2.4 Atividades biológicas de constituintes do gênero <i>Annona</i>	18
2.5 Microflora endodôntica	20
2.6 Atividade antimicrobiana das drogas utilizadas nas infecções endodônticas	26
2.7 Atividade antimicrobiana de plantas e produtos naturais	35
2.8 Atividade biológica de plantas e produtos naturais nas infecções bucais	44
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>59</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>61</b>
4.1 Etapa Química I	61
4.1.1 Escolha da planta	61
4.1.2 Obtenção dos solventes	61
4.1.3 Seleção dos extratos	61
4.1.4 Preparação dos extratos brutos da planta	62
4.1.5 Obtenção dos reveladores	62
4.1.6 Revelação das placas	62
4.1.7 Métodos cromatográficos	62
4.1.7.1 Cromatografia em Camada Delgada Analítica	62
4.1.7.2 Cromatografia em Coluna	63
4.1.7.2.1 Coluna Cromatográfica em gel de Sílica	63
4.1.7.2.2 Coluna Cromatográfica em gel Sephadex LH 20	63
4.1.8 Obtenção das frações e sub-frações do extrato etanólico da <i>Annona crassiflora</i> Mart. ( madeira da raiz)	63
4.1.8.1 Filtração do extrato bruto	63
4.1.8.2 Filtração em gel de Sílica da fração em etanol:água1:1 (f-1)	64
4.1.8.3 Filtração em gel de sílica da fração em etanol do extrato bruto da madeira da	



<i>Annona crassiflora</i> Mart	65
4.1.8.4 Filtração do extrato etanólico bruto da casca da raiz da <i>Annona crassiflora</i> Mart.	65
4.2 Etapa microbiológica I	66
4.2.1 Microrganismos utilizados nos testes	67
4.3 Etapa microbiológica II	67
4.3.1 Preparação das amostras da <i>Annona crassiflora</i> Mart	68
4.3.2 Preparação e padronização dos discos	68
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos aeróbios	68
4.4.1 Microrganismos	68
4.4.2 Cultura dos microrganismos	68
4.4.3 Padronização do inóculo	69
4.4.4 Método	69
4.4.5 Leitura	69
4.5 Determinação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos anaeróbios	70
4.5.1 Microrganismos	70
4.5.2 Meio de cultura	70
4.5.3 Padronização do inóculo	70
4.5.4 Método	70
4.5.5 Leitura	71
4.6 Etapa QuímicaII	71
4.6.1 Obtenção dos constituintes químicos	71
4.6.2 Isolamento dos compostos químicos	72
4.7 Etapa microbiológica III	73
4.7.1 Padronização das soluções para determinação da CIM	74
4.7.2 Padronização do inóculo	74
4.7.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	74
4.7.4 Leitura	75
4.7.5 Identificação dos compostos químicos	76
5.RESULTADOS	78
6.DISSCUSSÃO	90
7 CONCLUSÕES	99
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1: Molécula do Lipopolissacarídeo bacteriano</b>	<b>4</b>
<b>FIGURA 2: Molécula do Lipídeo A tóxica</b>	<b>5</b>
<b>FIGURA 3: Molécula do Lipídeo A atóxica</b>	<b>6</b>
<b>FIGURA 4: <i>Annona crassiflora</i> Mart. (4a-Árvore, 4b-Folhas e fruto e 4c-casca</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA 5: Filtração do extrato etanólico bruto da madeira da raiz</b>	<b>63</b>
<b>FIGURA 6: Filtração da fração EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (F1) do extrato bruto da madeira da raiz</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 7: Filtração da fração em etanol (F1) do extrato etanólico bruto da madeira da raiz</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 8: Filtração do extrato etanólico bruto da casca da raiz (FCR)</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 9: Fotomicrografia da formação do halo de inibição pelo método de difusão em ágar pelo método do disco</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 10: Ausência de crescimento anaeróbio</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 11: Presença de crescimento anaeróbio</b>	<b>71</b>
<b>FIGURA 12: Frações purificadas da amostra 08</b>	<b>72</b>
<b>FIGURA 13: Frações purificadas da amostra 10</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 14: Frações purificadas da amostra 12</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 15: 1ª Microplaca após a revelação</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 16: 2ª Microplaca após a revelação</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 17: Percentagem de cepas sensíveis as frações e sub-frações do extrato de <i>Annona crassiflora</i> Mart</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA 18: Percentagem de cepas sensíveis as frações e sub-frações do extrato de <i>Annona crassiflora</i> Mart.</b>	<b>84</b>
<b>FIGURA 19: Concentração inibitória mínima (CIM)</b>	<b>86</b>
<b>FIGURA 20: Concentração inibitória mínima (CIM)</b>	<b>86</b>
<b>FIGURA 21. Trans(16,19)-Goniodonina. (Trans-epi (16,19,34)-Goniodonina).</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 22. Cis(16,19)-Goniodonina. (Cis-epi (16,19,34)-Goniodonina).</b>	<b>88</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1: Classe de compostos encontrados na família Annonacea</b>	<b>12</b>
<b>TABELA 2: Qualificação botânica do marolo</b>	<b>16</b>
<b>TABELA 3: Dados etnofarmacológicos de Anonáceas</b>	<b>17, 18</b>
<b>TABELA 4: Dados etnofarmacológicos de drogas utilizadas nas infecções endodônticas</b>	<b>34, 35</b>
<b>TABELA 5: Atividade antimicrobiana de extratos de plantas e produtos naturais</b>	<b>42, 43</b>
<b>TABELA 6: Atividade biológica de plantas e produtos naturais frente. as infecções bucais.</b>	<b>56, 57</b>
<b>TABELA 7: Amostras originadas do extrato bruto etanólico da madeirada raiz (MR FMR) e da casca da raiz (FCR) de <i>Annona crassiflora</i> Mart.</b>	<b>66</b>
<b>TABELA 8: Drogas alopáticas utilizadas nas infecções endodônticas</b>	<b>.67</b>
<b>TABELA 9: Microrganismos utilizados no ensaio microbiológico</b>	<b>67</b>
<b>TABELA 10: Amostras selecionadas após análise antimicrobiana</b>	<b>72</b>
<b>TABELA 11: Amostras analisadas pelo método de RMN</b>	<b>76</b>
<b>TABELA 12: Resultado da avaliação antimicrobiana frente ao <i>Enterococcus faecalis</i></b>	<b>78</b>
<b>TABELA 13: Resultado da avaliação antimicrobiana frente a <i>Candida albicans</i></b>	<b>79</b>
<b>TABELA 14: Resultado da avaliação antimicrobiana frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>80</b>
<b>TABELA 15: Resultado da avaliação antimicrobiana frente aos microrganismos Anaeróbios</b>	<b>83</b>
<b>TABELA 16: Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b>	<b>85</b>
<b>TABELA 17: Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono da trans (16,19) Goniodonina</b>	<b>87</b>
<b>TABELA 18: Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de trans, epi (16,19,34) Goniodonina</b>	<b>87</b>
<b>TABELA 19: Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono da cis (16,19) Goniodonina</b>	<b>87</b>
<b>TABELA 20: Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono da cis, epi (16,19,34) Goniodonina</b>	<b>87</b>
<b>TABELA 21: Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono das acetogeninas isoladas</b>	<b>88</b>
<b>TABELA 22: Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de anéis metil-<math>\gamma</math>-Lactona de acetogenina</b>	<b>88</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>CIM</b>	<b>Concentração Inibitória Mínima</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolissacarídeo</b>
<b>RMD</b>	<b>Bombas de resistência a multidrogas</b>
<b>IBEs</b>	<b>Inibidores da bomba de efluxo</b>
<b>OMS</b>	<b>Organização Mundial de Saúde</b>
<b>Tab</b>	<b>Tabela</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleucina-1</b>
<b>TNF</b>	<b>Fator de Necrose Tumoral</b>
<b>PMC</b>	<b>Paramonoclorofenol</b>
<b>PMCC</b>	<b>Paramonoclorofenol canforado</b>
<b>CHX</b>	<b>Clorexidina</b>
<b>ANA</b>	<b>Método de avaliação microbiológica</b>
<b>RAR</b>	<b>Raspagem e alisamento radicular</b>
<b>MTA</b>	<b>Agregado Trióxido Mineral</b>
<b>ZOEP</b>	<b>Pasta de Óxido de Zinco e Eugenol</b>
<b>CTZP</b>	<b>Pasta de Clorafenicol + Cloreto de Tetraciclina + Óxido de Zinco e Eugenol</b>
<b>ANG</b>	<b>Resíduo oleoso</b>
<b>EHC</b>	<b>Extrato hidro-metanólico Concentrado</b>
<b>SEHC</b>	<b>Sobrenadante do Extrato hidro-etanólico Concentrado</b>
<b>FHEX</b>	<b>Fração hexânica</b>
<b>EB</b>	<b>Extrato Etanólico Bruto de <i>Erythrina velutina</i> Willd.</b>
<b>ATCC</b>	<b>Coleção de Cultura Tipo Americana</b>
<b>EBEtOH</b>	<b>Extrato Etanólico Bruto de <i>Ottonia martiana</i> Miq</b>
<b>Rf</b>	<b>Fator de retenção</b>
<b>TLC</b>	<b>Cromatografia de Alta Eficiência</b>
<b>PACs</b>	<b>Proantocianidinas</b>
<b>UnB</b>	<b>Universidade de Brasília</b>
<b>CCD</b>	<b>Cromatografia de Camada Delgada</b>
<b>MR</b>	<b>Madeira da raiz</b>
<b>FMR</b>	<b>Fração Madeira da Raiz</b>
<b>CR</b>	<b>Casca da raiz</b>

<b>FCR</b>	<b>Fração Casca da Raiz</b>
<b>HEX</b>	<b>Hexano</b>
<b>Lab</b>	<b>Laboratório</b>
<b>IC</b>	<b>Isolado clínico</b>
<b>IQB</b>	<b>Instituto de Química e Biotecnologia</b>
<b>UFAL</b>	<b>Universidade Federal de Alagoas</b>
<b>FOUFAL</b>	<b>Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas</b>
<b>UFPEDA</b>	<b>Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco</b>
<b>sp</b>	<b>Sem patogenicidade</b>
<b>DMSO</b>	<b>DimetilSulfóxido</b>

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart., frente a microrganismos da microflora endodôntica. Foram utilizados os microrganismos aeróbios, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungo *Candida albicans* e anaeróbios, *Prevotella melanogenica*, *Clostridium sp.*, e *Bacteróides fragilis*. A metodologia utilizada envolveu a preparação do extrato etanólico, a partição líquido-líquido e separação por meio de cromatografia em colunas usando como suporte o gel de sílica G 60, gel de sílica G-60 com 10% de KOH e Sephadex LH-20. O procedimento de purificação foi acompanhado pelo bioensaio da atividade antimicrobiana. A identificação dos compostos químicos das frações ativas do extrato da madeira e da casca da raiz da *A. crassiflora* foi feita pelo uso das técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IV e UV e espectrometria de massa. No ensaio de atividade antimicrobiana, para os microrganismos aeróbios, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* e fungo *C. albicans*, foi adotado o método de difusão em meio sólido pela técnica do disco. Para os microrganismos anaeróbios *P. melanogenica*, *Clostridium sp* e *B. fragilis* foi utilizado o método da difusão em caldo tioglicolato. Também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) das frações ativas do extrato da madeira e da casca da raiz da *Annona crassiflora* comparando-se com a concentração inibitória mínima (CIM) das drogas padrões (Fluconazol, Ofloxacina, Metronidazol) e com o Hidróxido de Cálcio utilizadas neste estudo. Os testes de avaliação antimicrobiana demonstraram que as frações do extrato etanólico da casca da raiz e madeira da raiz da *A. crassiflora* Mart. não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana frente ao *E. faecalis*, entretanto, apresentaram resultado positivo quanto à ação antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* e a *C. albicans*. Este estudo também demonstrou que as frações do extrato etanólico da casca da raiz e madeira da raiz da *A. crassiflora* Mart. apresentaram ação antimicrobiana frente à *P. melanogenica*, *Clostridium sp*, e *B. fragilis*, demonstrando ter no entanto maior espectro antimicrobiano para o *Clostridium sp*. Das frações ativas do extrato da *A. crassiflora* Mart., A6, A10, A11 e A13 foi obtida a acetogenina *Goniodonina* que apresentou nas amostras A11 e A13 um CIM=1000 $\mu\text{g/mL}$  para *C. albicans* e *Clostridium sp*, CIM=2000 $\mu\text{g/mL}$  para *P. aeruginosa* e *B. fragilis* e CIM>2000 $\mu\text{g/mL}$  para *P. melanogenica* enquanto nas amostras A6 e A10 apresentou um CIM=2000  $\mu\text{g/mL}$  para *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *B. fragilis*, CIM>2000 $\mu\text{g/mL}$  para *P. melanogenica* e CIM=62 $\mu\text{g/mL}$ . As amostras A3, A7 e A12 apresentaram um espectro de RMN semelhante das acetogeninas sem a presença do anel lactônico e demonstraram a mesma atividade antimicrobiana para a *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *B. fragilis* (CIM=2000 $\mu\text{g/mL}$ ) e para a *P. melanogenica* (CIM>2000  $\mu\text{g/mL}$ ). Para o *Clostridium sp* as amostras A3 e A7 apresentaram CIM=62  $\mu\text{g/mL}$  enquanto a amostra A12 apresentou um CIM =500 $\mu\text{g/mL}$ .

## ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract of the *Annona crassiflora* Mart., against the microorganisms of the endodontic microflora, aerobic, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungi, *Candida albicans* and anaerobes, *Prevotella melanogenicus*, *Clostridium sp.*, and *Bacteroides fragilis*. The methodology used involved the preparation of the ethanolic extract, the liquid-liquid partition and chromatographic purification using G 60 silica gel, silica gel with 10% of KOH and activated silica gel and LH-20 Sephadex. Procedure of purification was followed by antimicrobial activity bioassay. The identification of chemical compounds from the active fractions of the *A. crassiflora* were made using the spectroscopic method of magnetic resonance of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ . The antimicrobial assay activity, for the aerobic microorganisms, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and fungi, *C. albicans* the diffusion method in disc was used. For the anaerobic microorganisms *P. melanogenicus*, *Costridium sp.*, and *B. fragillis* the the diffusion method in broth tioglicolato was used. Also the minimum inhibitory concentration (MIC) of the active fractions from the wood, bark and stem extracts of the *A. crassiflora* were determined and compare with the minimum inhibitory concentration (MIC) of the standards drugs (Fluconazol, Ofloxacin, Metronidazole) and Calcium Hydroxyde used in this study. The antimicrobial evaluation tests demonstrated that the fractions of bark and wood ethanolic extracts the *A. crassiflora* Mart., did not present antimicrobial activity against the *E. faecalis*, however, presented positive activity but presented antimicrobial activity against the *P. aeruginosa* and the *C. albicans*. This study also demonstrated that the bark and stem fractions of the ethanolic extracts of the *Annona crassiflora* Mart., presented antimicrobial activity against the *P. melanogenicus*, *Clostridium sp.*, and *B. fragilis*, however bigger expectrum antimicrobial activity was for the *Clostridium sp.* Of the active fractions of the extract of the *A. crassiflora* Mart., A6, A10, A11 and A13 were gotten the acetogenin Goniodonin that presented in the samples A11 and A13 a CIM=1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *C. albicans* and *Clostridium sp.*, CIM=2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *P. aeruginosa* and *B. fragilis* and CIM>2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *P. melanogeniccus* while in the samples A6 and A10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for C presented a CIM=2000. *albicans*, *P. aeruginosa* and *B. fragilis*, CIM>2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *P. melanogenica* and CIM=62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The samples A3, A7 and A12 had presented one expectro of similar RMN of the acetogenins without the presence of the lactônico ring and had demonstrated the same antimicrobiana activity for the *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *B. fragilis* (MIC=2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and *P. melanogeniccus* (MIC>2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) while for the *Clostidium sp* the samples A3 and A7 had presented a MIC=62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  while a sample A12 had presented a MIC=500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO



## INTRODUÇÃO

A endodontia, dentre suas multiplicidades de estudos, tem intensificado investigações concernentes às alterações patológicas que envolvem a polpa e suas repercussões através do sistema de canais radiculares nos tecidos da região periapical.

Estudos comprovam que o pH, aeração, umidade, exsudatos, células descamadas, restos alimentares e a condição adequada de temperatura favorecem o crescimento de uma flora microbiana ampla e variada na cavidade oral (BIRAL, 1974).

Desse modo, a lesão periapical é considerada como uma infecção endógena causada pela microflora oral. A infecção bacteriana da polpa dental resulta em destruição pulpar e subsequentemente estimula as células inflamatórias responsáveis pela destruição do osso no periapice (RANI & CHOPRA, 2006).

Portanto, um dos primeiros objetivos do tratamento endodôntico de um dente apresentando polpa necrosada, é a eliminação dos microorganismos do sistema de canais radiculares com efetividade, especialmente nos casos de lesões periapicais crônicas (PANZARINI et al, 2006).

As bactérias constituem a principal causa da doença pulpar. A infecção do espaço pulpar é comumente uma extensão da contaminação oral. É bem reconhecido que existem alguns caminhos diferentes pelos quais a microflora oral pode ter acesso até a polpa e impedir sua função. As vias mais comuns são a extensão direta de lesões cáries e pelo preparo de cavidades as quais frequentemente abrem acesso extensivo na dentina tubular (GOMES et al, 1996).

A maioria dos insucessos nos tratamentos é promovida pelos microorganismos que persistem no terço apical dos canais radiculares de dentes obturados (NAIR, 1990).

Os canais radiculares de dentes decíduos com polpa necrosada e lesão periapical crônica apresentam um número alto de microorganismos e infecção polimicrobiana com prevalência de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (PAZELLI et al, 2003)

Entretanto, a baixa tensão de oxigênio, suprimento de nutrientes e queda da defesa natural beneficia as interações entre os microorganismos guiando para o atual reconhecimento de que a maioria das infecções pulpares e periapicais é mista ou poli microbiana composta por microorganismos aeróbios estritos, anaeróbios facultativos e com predominância dos anaeróbicos estritos (MOLLER, 1966, MOLLER et al, 1981, SUNDQVIST, 1976, DAHLEN & MOLLER, 1990, FABRICIUS et al, 1982, ROCHA ECT al, 1998, SAINI ECT al, 2004.).

A composição da micro biota nas infecções endodôntica varia consideravelmente destacando-se gêneros como, anaeróbicos (Cocos Gram+ (*Peptotryptococcus*) e Gram- (*Veillonella*), Bastonetes Gram+ (*Actinomices*, *Eucobacterium*, *Propionibacterium*) e Gram- (*Phorphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Campylobacter*), Espiroquetas (*Treponema*) e aero-micro-facultativos (Cocos Gram+ (*Streptococcus* e *Enterococcus*) e Gram – (*Neisseria*), Bastonetes Gram+ (*Actinomyces*, *Lactobacillos* e *Corynebacterium*) e Gram- (*Capnocytophaga* *Staphylococcus aureus* e *Eikenella*) e Leveduras (*Candida*) (NAIR, 1997).

Em virtude disso, a microbiologia laboratorial desempenha um papel importante em providenciar informações sobre as infecções cirúrgicas que lentamente se agravam ou do contrário declinam para a cura. Os principais patógenos ou grupos de microrganismos que a microbiologia rotineiramente detectou e relatou (com antibiogramas quando apropriado) foram os seguintes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus  $\beta$ -hemolítico*, bactéria coliforme, anaeróbicos Gram- pigmentados (*Prevotella* e *Porphyromonas ssp.*), anaeróbicos Gram- não pigmentados (principalmente *Bacteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella* e *Fusobacterium ssp.*), *Peptostreptococcus ssp.*, e *Clostridium ssp* (BOWLER et al, 2001).

Outrossim, espécies do gênero *Enterococcus* têm importante significado na microbiologia endodôntica. Essas bactérias possuem resistência inerente a agentes antimicrobianos e se não controladas podem ser favorecidas pela alteração nas condições ecológicas dos canais e estabelecer um processo infeccioso de difícil tratamento. Representantes desse gênero, de modo especial, foram relacionados a casos de insucesso no tratamento endodôntico (MOLANDER et al, 1998, SUNDQVIST et al, 1998).

Além disso, SEN et al (1995), observaram canais radiculares com polpa necrótica densamente invadidos por leveduras e WALTIMO et al, em 1997, detectaram a ocorrência de leveduras em 72% de 967 amostras colhidas de canais radiculares com infecções endodônticas persistentes, pertencentes na sua maioria absoluta ao gênero *Candida*.

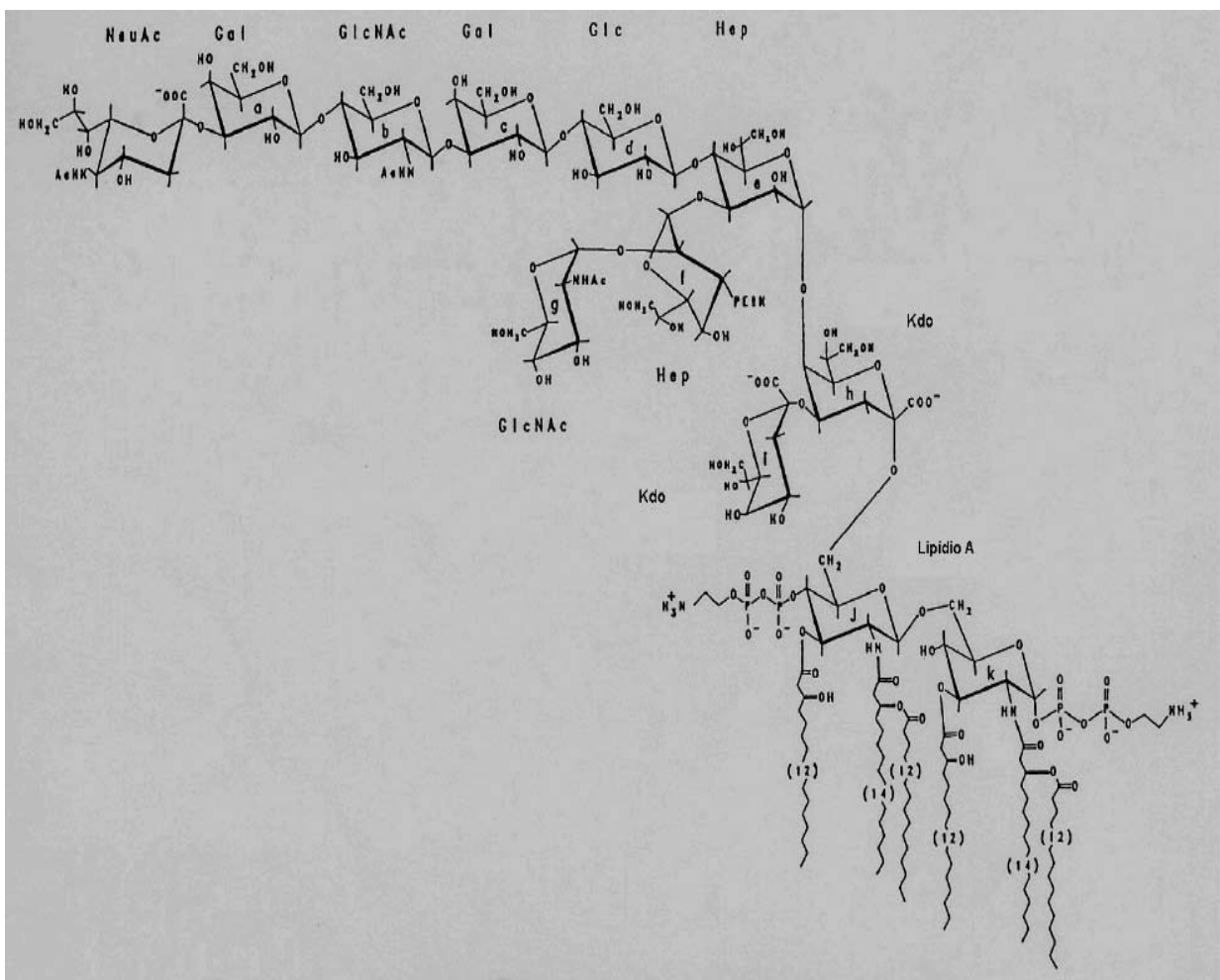
MENIM (1993), reconheceu a resistência de uma amostra de *Candida albicans* a uma solução de ácido cítrico a 25%, após 15 minutos de exposição in vitro, sugerindo que essa levedura pode ter grande importância nas patologias resistentes ao tratamento endodôntico convencional.

Portanto, considerando-se os microrganismos orais, as bactérias possuem a maior importância entre os agentes patogênicos, participando da etiologia de doenças endógenas como a cárie, doença periodontal, patologias pulpares e periapicais (ESTRELA & FIGUEIREDO, 1999).

Desse modo, quando os canais radiculares são invadidos por microorganismos, encontramos em geral bactérias Gram+ e Gram-, aeróbicas e anaeróbicas (BIRAL, 1974).

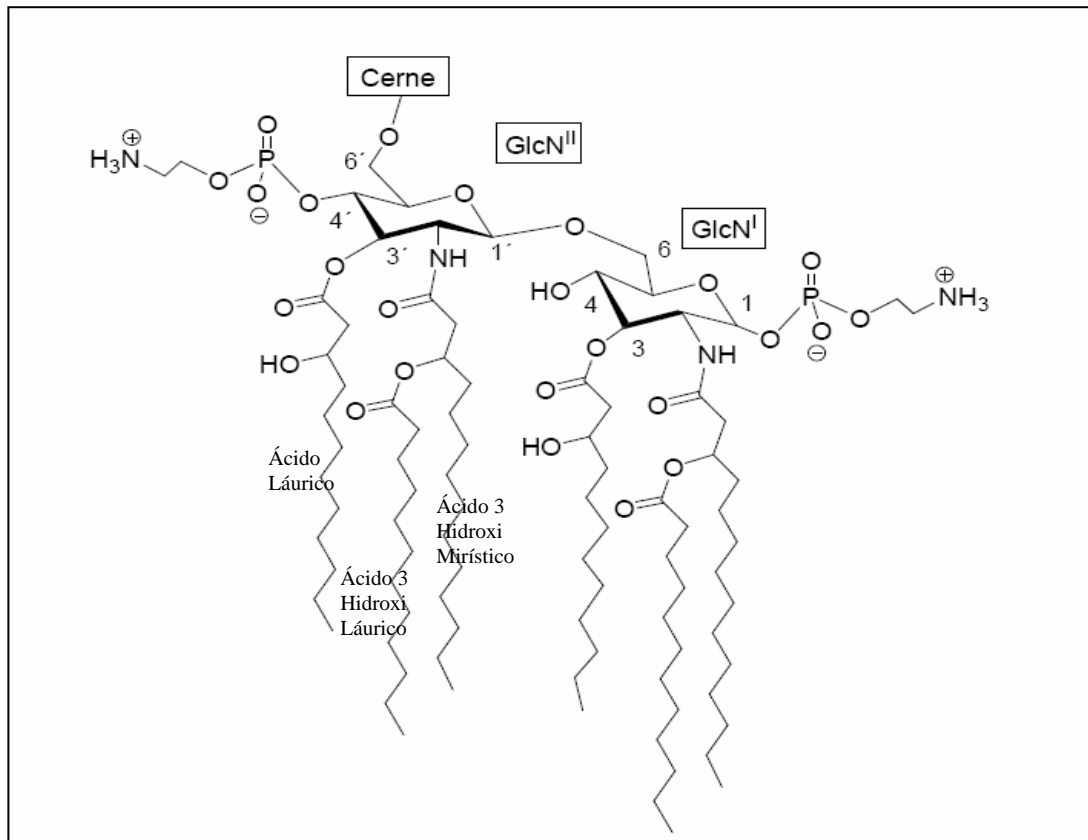
A infecção anaeróbica é motivada por bactérias que são intolerantes ao oxigênio. A maioria dessas infecções são misturas envolvendo mais do que um microorganismo anaeróbico mas, muitas vezes ocorrem bactérias aeróbicas ou facultativas. As bactérias Gram+ (*Peptostreptococcus*, *Clostridium*) e Gram- (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*), são os patógenos anaeróbicos mais comuns e uma das causas predisponentes da infecção anaeróbica produzida pelos microorganismos inclui o fator de virulência tais como toxinas, cápsulas e enzimas (colagenase, hialuronidase e outras) (ROWLAND, 2007).

Por conseguinte, os microorganismos anaeróbicos Gram negativos apresentam uma endotoxina que é um polissacarídeo composto de açúcares polimerizados e lipídeos complexos contendo ácidos graxos. Esta endotoxina também chamada de lipopolissacarídeo (LPS) tem sido vista no nosso tecido como prenúncio de fracasso do tratamento. (Fig.1).



**Figura 1.** Molécula do Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), FERNANDES, (2005).

Durante o tratamento endodôntico existe uma particularidade importante em virtude da endotoxina (LPS) ser liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana promovendo uma série de efeitos biológicos, os quais, conduzem para uma reação inflamatória e reabsorção óssea periapical. O lipídeo A é a região da endotoxina responsável pelos efeitos tóxicos (Fig. 2) (RIETSCHEL & BRADE, 1992, WESTPHAL, 1975, STASHENKO, 1990, YAMASAKI et al, 1992).

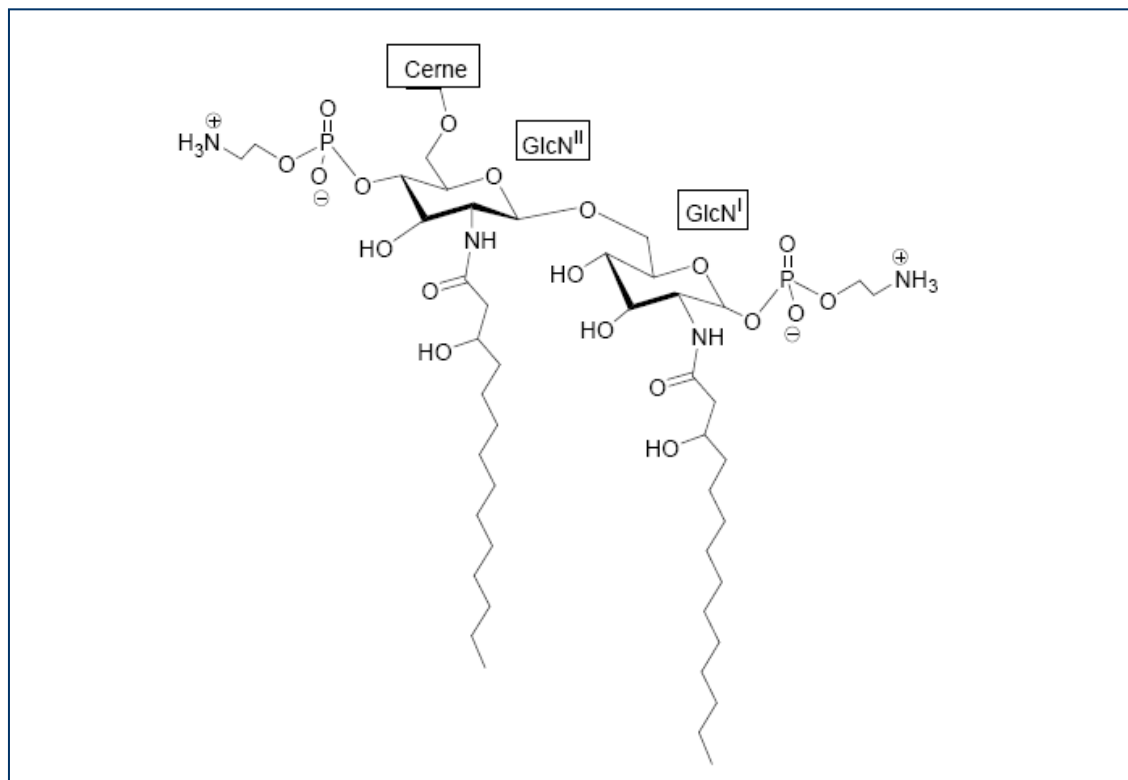


**Figura 2.** Molécula do Lipídeo A tóxica, FERNANDES, (2005).

Logo, o maior objetivo do tratamento dos canais radiculares de dentes com polpa necrosada e lesões periapicais crônicas seria não somente a morte bacteriana, mas também a inativação do lipídeo A o qual é a porção tóxica da endotoxina. No entanto, este objetivo não é conseguido somente com curativos antibacterianos que apenas matam a bactéria, a qual entretanto, permanece no sistema de canal radicular após a preparação biomecânica, favorecendo o surgimento das patologias periapicais (LEONARDO et al, 2004).

Do mesmo modo, SAVAFI & NICHOLS (1993) avaliando o efeito do hidróxido de cálcio frente ao LPS bacteriano demonstraram que este composto hidrolisa os lipídeos do LPS

bacteriano resultando na liberação de ácidos graxos livres e amino açúcares, inativando sua toxicidade (Fig. 3 ).



**Figura 3.** Molécula do Lipídeo A atóxica, Fernandes (2005).

Entretanto, FRANK et al (1979), afirmam que o hidróxido de cálcio não é o fator principal para o sucesso do tratamento endodôntico e sim a obliteração do sistema de canais com um material sólido obturador tal como a Guta –Percha.

No entanto, hoje, o hidróxido de cálcio é o medicamento endodôntico de uso mais comum. Sua eficácia e seu uso ao longo do tempo tem sido provado por meio de diversos trabalhos (HERMAN 1920 apud ESTRELA 1999,. PANZARINI et al, 2006). O mecanismo de ação dessa substância sobre os microrganismos pode ser explicado pela influencia do pH no crescimento, metabolismo e divisão celular da bactéria (HERMAN 1920 apud ESTRELA 1999, ESTRELA & HOLLAND 2003).

O efeito biológico do pH na atividade enzimática da bactéria anaeróbica é proveniente da ação que os íons hidroxilas do hidróxido de cálcio desenvolvem na membrana citoplasmática, em virtude dos sítios enzimáticos serem aí localizados. Esta membrana é responsável pela manutenção das funções essenciais tais como: metabolismo, divisão celular, crescimento e além disso faz parte do estágio final de formação da parede celular, biosíntese de lipídeos, transporte de elétrons e fosforização oxidativa. O efeito do pH elevado do hidróxido de cálcio altera a integridade da membrana citoplasmática através de injúria

química aos componentes orgânicos alterando o transporte de nutrientes, ou por meio da destruição dos fosfolípidios ou dos ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática, através de um processo de peroxidação da dupla ligação e de uma reação de saponificação (ESTRELA et al, 1994, 1995).

Os mecanismos químicos que podem levar uma bactéria a se tornar resistente, são: a produção de enzimas que modificam a molécula do agente antibacteriano tornando-o inativo; a diminuição da permeabilidade à entrada do agente antibacteriano; a alteração do alvo; a síntese de novas enzimas que não sofrem ação do agente antibacteriano e a expulsão do agente antibacteriano da célula (Bomba de efluxo). A resistência bacteriana tem emergido como um problema de importância mundial, fazendo com que muitas classes de agentes antimicrobianos tenham se tornado menos efetiva nos últimos anos. Algumas vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes (JONES et al, 1994).

O efluxo ativo de compostos tóxicos para fora das células é um mecanismo geral que as bactérias desenvolveram para se protegerem de sua ação. Os antibióticos muito usados clinicamente estão entre estes compostos, e sua exclusão de células bacterianas implica na diminuição de sua eficiência clínica. Os antibióticos são expelidos das células por proteínas transportadoras de membranas, também conhecidas como bombas de efluxo de drogas. As bombas de efluxo particularmente interessantes são aquelas capazes de expulsar das células uma grande variedade de compostos estruturalmente relacionados, mas com diferentes modos de ação antimicrobial (LOMOVSKAYA *et al*, 2001). Estas proteínas transportadoras de membranas são chamadas de bombas de resistência à multidrogas (RMD) e certamente é um fator complicante na quimioterapia de infecções bacterianas e torna imprescindível a identificação dos Inibidores da Bomba de Efluxo (IBEs) (VAN BAMBEKE *et al* 2000 e 2003).

Muitas vezes, modificações estruturais são realizadas nas moléculas de agentes antimicrobianos já utilizados na prática clínica para que se tornem mais efetivos frente a microrganismos resistentes. No final dos anos 80, as Fluoroquinolonas (Tab.4), tornaram-se uma excelente opção para o tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbicas Gram negativas pois além de potentes, essas drogas permitiam a continuação do tratamento por via oral (GALLES et al 1997; PROSSER & BESKID 1995; SADER et al 1992).

BOULOS (1993), avaliando a eficácia do Fluconazol (Tab.4) no tratamento de infecções fúngicas, concluiu que esta droga é eficaz e de baixa toxicidade para tratar criptocose e candidíase.

LOESCHE et al (1992), afirmam que o Metronidazol (Tab.4) é um agente bactericida indicado para o uso contra um número restrito de microrganismos anaeróbicos, seguro para o uso humano, e que tem sido amplamente estudado, porém apresenta alguns resultados contraditórios, que podem ser explicados pela utilização desta droga nos casos onde não existe sua indicação apropriada ou a infecção anaeróbica não tenha sido estabelecida por diagnóstico preciso.

Do mesmo modo, SILVA (1998), afirma que dentre as medicações sistêmicas utilizadas para combater os microrganismos anaeróbicos encontrava-se o metronidazol, que atua interferindo nas vias metabólicas responsáveis pela transferência de hidrogênio, tornando-se um metabólito tóxico para a célula bacteriana.

Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos a sua utilização pelas populações mais carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares até a obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento. Em virtude disso, ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais para tratamento cura e prevenção de doenças, sendo uma das formas mais antigas da prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde ( VEIGA JUNIOR et al, 2005).

Novos agentes farmacologicamente ativos obtidos pela seleção de extratos de plantas têm levado a descoberta de muitas drogas clinicamente úteis no tratamento de patologias humanas ( CHU 1998; YUNES & CECHINEL 1998).

Avaliando a atividade bacteriana de fitoterápicos comerciais frente a microrganismos cariogênicos, observou-se, que o Malvaticin apresentou o melhor espectro antimicrobiano frente a todas as espécies testadas enquanto a Água Rabelo não apresentou atividade bacteriana. Entretanto, em outro estudo, avaliando os efeitos dos extratos de *Ziziphus joazeiro* (joazeiro), *Cocos nucifera* (coco cravo), *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira), *Aristolochia birotris* (milhomen) e a *Croton cajucara* (sacaca), sobre a microbiota oral de pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo, ALVIANO (2004), demonstrou que com a identificação dos compostos presentes em cada planta, pode-se obter agentes antimicrobianos mais específicos, eficazes e acessíveis. Por outro lado, BARBOSA et al (2004), demonstraram a eficácia do extrato aquoso do guaraná frente a placa bacteriana dentária. Do mesmo modo,

em outro estudo, LIMA JUNIOR et al (2005), avaliando o uso de fitoterápicos na saúde bucal, afirmam que no que tange às plantas empregadas na prevenção, tratamento ou cura das afecções bucais, as mais relevantes são a romã, aroeira, cajueiro, malva do reino e malva corama, utilizadas no tratamento de inflamações, odontalgias e processos cicatriciais. Dessa forma, esses extratos de plantas apresentam atividade anti-cárie, antiinflamatória, analgésica e cicatrizante, contribuindo para a prevenção e cura das patologias bucais (DRUMOND et al, 2004).

Alguns estudos demonstram a eficácia de extratos de plantas frente a microrganismos que compõem o biofilme bacteriano da placa dental e os efeitos de diferentes extratos vegetais na aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. De todos os vegetais testados, somente os extratos de folha de araçá, folha da aroeira do sertão, caule da cancerosa, casca da candeia, folha da figueira, folha da guajuvira, casca de jacarandá, folha de jacarandá caroba apresentaram a capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Os extratos de figueira e de jacaranda caroba não foram capazes de inibir significativamente os microrganismos no biofilme. (UENO 2001; ALVIANO 2004; BARBOSA et al 2004; BIANCO 2004; BUFFON 2005; BARRETO et al 2005, MELO et al 2006). No entanto outro estudo, de atividade antibacteriana contra bactérias presentes na placa dentária, demonstra que o extrato bruto etanólico de *Aster lanceolatus* inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados, com ênfase para a inibição da bactéria *Staphylococcus aureus* superando o resultado obtido com o controle positivo (DIAS et al, 2005).

Estudo do potencial antimicrobiano *in vitro* de 7 dentífricos contendo fitoterápicos (Erva Doce, Melissa, Hortelã, Juá, Malva, Própolis, Canela, Menta, Camomila, Salvia, Mirra e Eucalipto), sobre cepas padrões e bactérias orais obtidas da saliva demonstrou que somente as soluções puras dos dentífricos apresentaram capacidade antimicrobiana equivalentes contra as cepas padrões, exceto o Gessy Cristal. Ademais, os dentífricos diluídos a 1:2 apresentaram ação antimicrobiana contra as bactérias orais obtidas da saliva, exceto o Parodontax® e Phillips (controle negativo). Isto demonstra que já existem cepas de microrganismos resistentes a determinados dentífricos contendo fitoterápicos e utilizados no combate e prevenção da cárie dental ou os fitoterápicos não são ativos contra aqueles microrganismos (BARRETO et al, 2005).

A atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados numa formulação obtida de gel dentífrico ressaltaram prováveis ações antiinflamatórias (flavonóides) e/ou antibacteriana (Taninos), porém estudos complementares são necessários para confirmar a



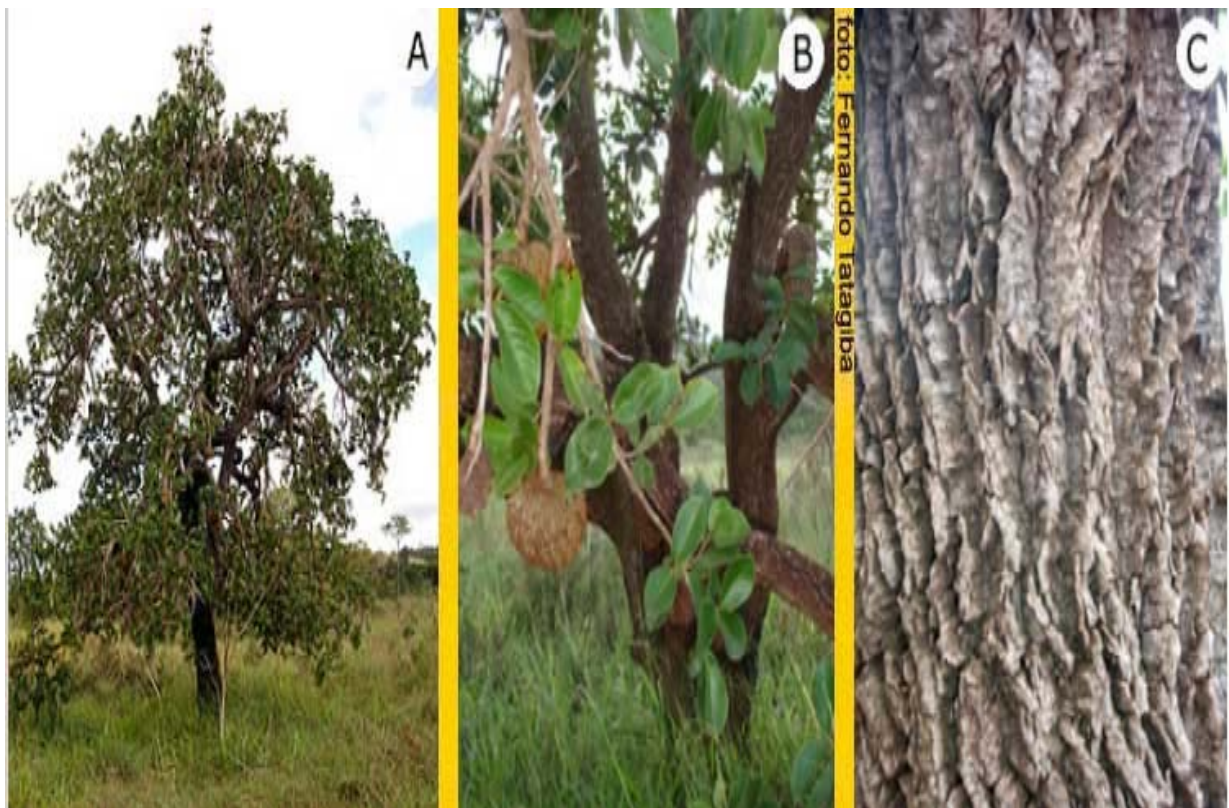
eficácia deste produto e sua utilização na prevenção e tratamento das doenças periodontais. (CORDEIRO et al 2006).

SILVA et al (2006), verificaram *in vitro*, o efeito antimicrobiano de tinturas fitoterápicas de Sálvia(*Salvia officinale*), Tanchagem (*Plantago major*) e Ipê-roxo (*Tabebuia* s.p.) frente a duas espécies bacterianas causadoras de doença periodontal (*Prevotella melanogenica* e *Porphyromonas gingivalis*). A Tanchagem e a Sálvia demonstraram ter melhor ação antibacteriana do que a tintura do Ipê-roxo, assim como BUFFON (2005), aplicando o extrato de agrião d'água (*Nasturtium officinale*) no controle da placa bacteriana demonstrou que as diferentes frações obtidas a partir do extrato bruto mostraram-se eficazes na inibição do crescimento de diferentes microrganismos presentes na cavidade bucal e na redução da formação de placa dentária, afirma ainda o autor que a placa dental é um dos fatores determinantes para o surgimento da cárie e doença periodontal, justificando dessa maneira, a utilização de medidas para o seu controle

Conferindo outras atividades biológicas dos extratos de plantas para a saúde bucal, observamos que em um estudo de controle da toxicidade *in vivo* do extrato bruto etanólico (EBEtOH) de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, um arbusto característico da Floresta Atlântica e conhecido pelos nativos do litoral paranaense como “anestésia”, devido à sua ação anestésica sobre a mucosa oral, CUNICO et al (2004), demonstraram que esta espécie vegetal não causa irritação, confirmada pelas ausências de edema, ressecamento e escaras na mucosa oral e junção labial dos animais testados. Apresentou assim ação benéfica sem apresentar sinais clínicos de toxicidade. MICHELIN em 2005, e LIMA et al em 2006 avaliando a atividade antimicrobiana de extratos de plantas obtiveram resultados satisfatórios de ação antimicrobiana frente a várias cepas de microorganismos, dentre eles, *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacilo subtilis*, *Proteus sp*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp*. Em outro estudo LIMA et al, em 2005 realizaram testes microbiológicos frente ao *Staphylococcus aureus* e demonstraram a eficácia do extrato etanólico da *Jatropha elliptica* na inativação da bomba de efluxo por meio do composto, piridina penta substituída (2,6-dimetil-4-fenil-piridina-3,5-acido dicarboxilato de dietila), que atua como inibidor da bomba de efluxo NorA e MsrA, e restabelece o nível de concentração da droga intracelular. Em outro trabalho, DELEHANTY, et al, (2007) estudaram a ligação e neutralização do Lipopolissacarídeo (LPS), o maior componente da membrana externa das células bacterianas Gram negativas e causador de graves enfermidades humanas, demonstrando que plantas que possuem proantocianidinas (PACs) (flavonóides e catequinas), são mais potentes na ligação

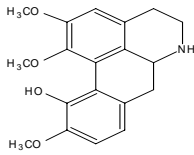
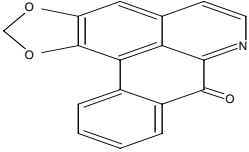
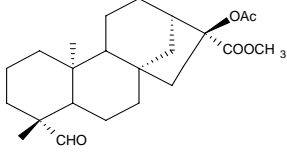
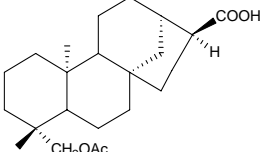
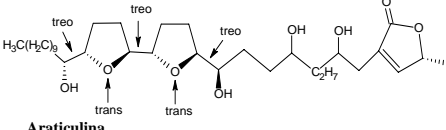
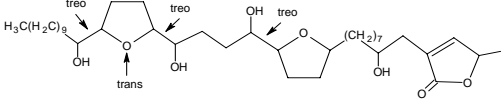
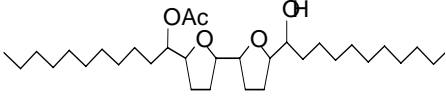
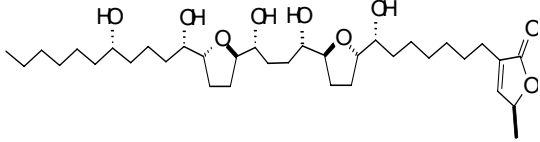
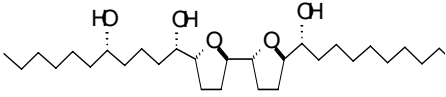
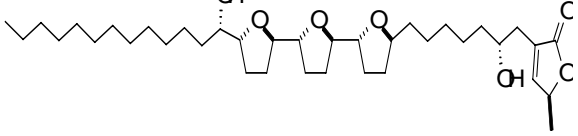
ao LPS, inativando-o, contribuindo desse modo para evitar o surgimento do choque séptico, pois devido a inativação da endotoxina (LPS) bacteriana, não existirá uma resposta imunológica desfavorável para o organismo.

Dentre as plantas estudadas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. ANTONIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA do laboratório de produtos naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas destaca-se a *Annona crassiflora* Mart. conhecida popularmente pelo nome de Araticum cortiça ou Marolo pertencente a família Annonaceae . Essa espécie tem importância alimentícia e a literatura descreve propriedades antimicrobianas, antifúngicas e bactericidas,(RIBEIRO E PASQUAL, 2005) (Fig.4). Apresenta constituintes como alcalóides ( Anonaina e Liriodenina), com propriedades antiparkisoniana, antitumorosa, antibactericida e antifúngica, diterpenos (Anoglabasina-A e Anoglabasina-B) com atividade antitumor, acetogeninas (Araticulina e Crassiflorina) com atividade citotóxica (CORRÊA & PENA 1984; LEBOEUF et al 1982; HOCQUEMILLER *et al* 1982; SANTOS et al 1994; 1996 e 1996), e outras acetogeninas (Uvaricina, Squamocina, Squamostatina e Goniocina), HIROSHI (2004) (**Tabela 1**).



**Figura 4.** *Annona crassiflora* Mart. A) Árvore. B) Folhas e fruto. C) Casca **Tatagiba** (2007).

**Tabela 1.** Classes de compostos encontrados na família Annonacea.

<u>Alcalóides</u>	
	
Anonaina	Lireodenina
<u>Diterpenos</u>	
	
Anoglabasina A	Anoglabasina B
<u>Acetogeninas</u>	
	
Araticulina	Crassiflorina
	
Uvaricina	Squamostatina-A
	
Squamocina	Goniocina

Neste presente trabalho avaliaremos a ação do extrato de planta como agente antimicrobiano frente a microorganismos da microflora endodôntica, em virtude de observar os trabalhos desenvolvidos no laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais do IQB-UFAL. Em trabalhos anteriores foi demonstrado a ação larvicida da *Annona crassiflora* frente ao mosquito *Aedes aegypti*, moluscicida frente ao molusco adulto *Biomphalaria glabrata* e

antimicrobiana frente a microrganismos, bactérias e fungo ( LIMA 2003,LIMA et al 2005; LIMA et al; 2006, LIMA et al; 2006, MARQUEZ et al 2005). Será estudada a ação antimicrobiana dos compostos isolados e identificados dos extratos vegetais com a perspectiva da obtenção de um coadjuvante eficaz e menos oneroso a ser utilizado na terapia das infecções pulpares e periapicais.

CAPITULO-2  
REVISÃO  
DA  
LITERATURA

## 2 – Revisão da literatura

### 2.1 – A FAMÍLIA ANNONACEA

A família Annonaceae compreende 120 gêneros, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A maioria dos representantes é constituída por plantas lenhosas, árvores e arbustos, com folhas inteiras, de disposição alterna dística e sem estípulas. Possui flores isoladas ou reunidas em inflorescências, grandes ou de tamanho pequeno, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado em cálice e corola, trimero (3 sépalas e 3 pétalas) carnosos. Apresenta numerosos estames dispostos em espiral e ovário súpero com carpelos numerosos em forma de espiral, livres entre si apocarpícos, com 1 a muitos óvulos. O fruto apocárpico baciforme e a semente possui endosperma ruminado. As sementes têm período de germinação muito lento. (LEBOEUF et al, 1982; Joly, 2002; MANNICA, 2003).

### 2.2 - O GÊNERO ANNONA

O gênero *Annona* é composto por várias espécies selvagens conhecidas por cabeça de negro, pinha, anona, ata, cherimólia, marolo, fruta do conde, pinha azeda, graviola e condessa (JOLY, 2002). Neste gênero incluem-se a ata ou fruta do conde ou pinha (*Annona squamosa*) cherimólia (*Annona cherimola* Mill.), condessa (*Annona reticulata* L.), graviola (*Annona muricata* L.), atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), araticum-do-campo (*Annona dióica*), Araticum-do-brejo (*Annona paludosa*), cabeça-de-negro (*Annona criacea*), Llama (*Annona diversifolia*) e araticum ou marolo (*Annona crassiflora* Mart.). Na medicina popular, algumas espécies têm propriedades anti-reumática, anti-helmíntica, parasiticida, carminativas e são utilizadas no tratamento de febres intermitentes, úlceras, aftas e pitíriase (dermatose) de crianças e animais. São ainda usadas na cultura ornamental e perfumaria; das raízes faz-se cortiça e da madeira, combustível, ripas, mastros de pequenas embarcações, remos e caixotes, (LEBOEUF et al 1982, JOLY, 2002 MANNICA, 2003, CORRÊA, 1984.).

### 2.3 - A ESPÉCIE ANNONA CRASSIFLORA Mart.

A espécie *Annona crassiflora* Mart. conhecida como araticum ou marolo, ocorre como um arbusto pequeno, de 1-4 metros, podendo chegar até 8-10 metros de altura;

caule sempre tortuoso; casca grossa, rugosa, suberosa, de até 3 centímetros de espessura, fendida longitudinalmente; ramos cinzentos e sulcados; folhas curto-pecioladas, geralmente elípticas curtamente e obtusamente acuminadas ou arredondadas no ápice, crasso membranosoglaucas e ferrugineo-hirsutas enquanto novas; flores verdes amareladas e sedosas, interiormente amarelo-ocraceas ou brancas, e pétalas muitíssimo carnosas; fruto baga ovóide-obtusa ou cônica, amarelo esverdeado e ferrugiso-tomentosa, com aréolas rombeas de até 18 centímetros de diâmetro longitudinal, contendo polpa branca, comestível, insípida, de cheiro agradável e semente pardo-avermelhada. A casca serve para confecção de bóias de redes e certas aplicações que se dá a cortiça, mas que não exijam impermeabilidade. Tem uma variedade de polpa vermelha mais doce e mais saborosa, a qual pode ser comida no estado natural e que também serve para fazer-se bebida refrigerante, ( CORRÊA & PENA, 1982).

Na tabela 2 encontra-se a classificação sistemática do marolo, *Annona crassiflora* Mart., segundo RIBEIRO E PASQUAL (2005). Afirmam os autores que na família Annonaceae os três gêneros mais importantes são a *Annona*, *Rollinia* e *Abernona*. Na tabela 3 para a *A. crassiflora* está descrito propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antibactericidas. O fruto dessa árvore típica dos cerrados e cerradões é muito apreciado devido ao seu aroma (RIBEIRO E PASQUAL, 2005).

**Tabela 2.** Classificação botânica do marolo.

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Subreino</b>	Embriophyta
<b>Divisão</b>	Spermatophyta
<b>Subdivisão</b>	Angiospermae
<b>Classe</b>	Dicotyledoneae
<b>Ordem</b>	Ranales
<b>Subordem</b>	Magnoliales
<b>Família</b>	Annonaceae,
<b>Subfamília</b>	Annonoideae
<b>Gênero</b>	<i>Annona</i>
<b>Espécie</b>	<i>Annona crassiflora</i> Mart.

**Tabela 3.** Dados Etnofarmacológicos de plantas da família Annonacea e gênero *Annona* relacionados a atividade antimicrobiana

Planta	Nome Popular	Parte testada	Extrato	Compostos Identificados	Uso Popular	Microrganismo (CIM/IC /ILµg/mL)	Referências bibliográficas
<i>Asterante asteras</i>	-----	Casca da raiz	Etanólico	2',3' epoxiasterantina e 2', 3' dihidroxi asterantina	Sonífero	<i>Saprolegnia asterophora</i> , e <i>Rhizoctonia solani</i>	NKUNIA, et al, 1996.
<i>Xylopia longifolia</i>	-----	Casca	Óleo essencial	Δ-cadinol, bornila	Acetato de Desinfetante	<i>Stahylococcus aureus</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> e <i>Candida albicans</i>	FOURNIER et al, 1993.
<i>Xylopia aethiopica</i>	-----	Fruto	Não citado	Ácido xilopico	Antimicrobiana	<i>Stafilococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	BOAKYE-YIADOM et al, 1977
<i>Xylopia emarginata</i>	Pindaíba reta	Folha e Fruto	Hexânico	Anonaina e Cariofileno	Não citado	Não testada	MOREIRA et al, 2003.
<i>Xylopia brasilienses</i>	Pidaíba	Ramo	Diclorometano	Aromadendrano - 4β,10α,15-diol	Não citado	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MOREIRA et al, 2005.
<i>Xylopia sp</i>	Pindaíba branca	Não citado	Não citado	Acido traquilobanico	Condimento culinário	<i>Stalococcus aureus</i> e <i>Bacilo subtilis</i>	TAKAHASHI et al, 2006.
<i>Annona cherimólia</i>	Cherimólia	Folha	Hexânico	Não identificados	Tratamento de tumores	<i>Sphyllococcus aureus</i> e <i>Bacilo subtilis</i> (CIM=100).	TAKAHASHI, 2006.
<i>Annona dióica</i>	Araticum do campo	Madeira	Madeira	Lireodenina (Alcalóide)	Anti-reumático e anti-diarreico	Não testada	SANTOS et al, 2003.
<i>Annona glabra</i>	Araticum do brejo	Casca do caule	Hexânico	Ácido(-)Kaur-16-em-19-oico	Utilizada contra insetos e parasitas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas pyocyanee</i> , <i>Microsporium gypseum</i> e <i>Epidermophyton flocosum</i> (CIM=500)	PADJAMA, et al, 1995.
<i>Annona jahnii</i>	Manirito	Ramo	Etanólico	Anodedienina e Janonacina	Não citado	IL <sub>50</sub> =194	COLMAN-SAIZARBITORIA T. et al, 1999.
<i>Annona muricata</i>	Graviola	Folha	Etanólpc	Não identificados	Tratamento de infecções	<i>Staphylococcus aureus</i> (CIM=100).(B. de Efluxo)	LIMA et al, 2005.
<i>Annona spinescens</i>	Araticum do rio	Fruto	Etanólico	Não identificados	Tratamento de úlceras	Não citado	FENER, 2006.



## Continuação da tabela 3.

<i>Annona reticulata</i>	Pinha	Caule	Etanólico	- Ácido (-) Kaur-16-en-19 - Ácido (-) Kaur-16 $\alpha$ -ol - 14-hidroxi-25-desoxiroliginina	Não citado	Não testado	ETSE et al, 1987.
<i>Annona squamosa</i>	Fruta do conde	Folha	Etanólico	Não identificados	Tratamento de furúnculo, úlceras e aftas	Não citado	FENER, 2006.
<i>Annona crassiflora Mart.</i>	Araticum cortiça	Folha, Fruto.	Etanólico	Não identificados	Antimicrobiano Antidiarreico	Stafilococcus aureus(CIM = 100).	LIMA et al, 2005.
<i>Annona crassiflora Mart.</i>	Araticum cortiça	Madeira	Etanólico	Aterosperimidina e *Lirodenina (Alcalóides)	Tratamento de picada de cobra	Não testada	GONÇALVES et al, 2006.
<i>Annona crassiflora Mart.</i>	Araticum Cortiça	Casca, Semente e Polpa	Etanólico	Fenóis (Não identificados)	Anti-diarreico	IC <sub>50</sub> =4,44 IC <sub>50</sub> =1,72 IC <sub>50</sub> =8,62	ROESLER et al, 2006.
<i>Annona Crassiflora Mart.</i>	Araticum cortiça	Semente	Etanólico	Lectinas (Não identificados)	Coagulante	Eritrócitos	CARAMORI et al, 2004.
<i>Annona crassiflora Mart.</i>	Araticum cortiça	Folha	Não citado	Liriodenina, Anonaina, Assimilobina e Reticulina	Tratamento da dor	Não Testada	HOCQUEMILLER et al, 1982.

## 2.4 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CONSTITUINTES DO GÊNERO

### ANNONA

HOCQUEMILLER et al (1982), avaliando o extrato etanólico das folhas e casca do caule da *Annona crassiflora* Mart., isolaram os alcalóides Lirodenina, Anonaina, Assimilobina e Reticulina que apresentaram atividade analgésica, espasmolítica e limitada atividade antibacteriana.

Avaliando o extrato EtOAc do caule da *Annona reticulata* (ETSE et al em 1987), identificaram os Diterpenos (-) ácido kaur-16-en-19-oico e (-) ácido kauran-16 $\alpha$ -ol por comparação direta com material isolado de *Xylopiya aethiopica* e *Xylopiya acutifolia*, ambos já haviam sido relatados anteriormente em outras espécies de *Annona* e o sesquiterpeno 4,5-óxido de cariofileno.

Investigando a atividade antimicrobiana de 14 alcalóides benzoquinolínicos frente aos microrganismos, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacilos*, *Lysteria*, *Escherichia*, *Salmonela*, *Klebsiela*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Shigella*, *Mycobacterium* e *Candida*, VILLAR et al em 1987 demonstraram que a Anolobina foi

quem apresentou maior atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas, enquanto a Anonaina, Lisicamina e liriodenina apresentaram menor atividade. A *Candida albicans* foi inibida pela Anonaina, Nornantenina e Xilopina. Nenhum dos alcalóides testados demonstraram ter ação bactericida contra as bactérias Gram-negativas.

Analisando a atividade antimicrobiana de alcalóides benzinoquinolínicos da casca do caule da *Annona cherimolia* SIMEON et al (1990), demonstraram que os compostos não fenólicos são mais ativos do que os compostos fenólicos quando existe uma substituição similar.

SANTOS & BOAVENTURA (1994), descreveram o isolamento e a determinação estrutural de uma acetogenina isolada das sementes de *Annona crassiflora* Mart. O extrato obtido com éter de petróleo das sementes de *Annona crassiflora* Mart foi submetido a partição entre hexano e metanol (9:1). A fração metanólica foi cromatografada em coluna de gel de sílica, e da fração eluída com acetato de etila /metanol (9:1) precipitou um sólido branco identificado como uma acetogenina bis-tetra-hidrofurânica denominada crassiflorina que apresentou atividade citotóxica contra células tumorais humanas.

PADJAMA et al, (1995) demonstrou substancial atividade antimicrobiana, antifúngica e moderada atividade inseticida, esporicida e citotóxica do extrato hexânico do caule da *Annona glabra* L. e isolou o ácido kaur-16-en-19 como o principal constituinte, ao qual atribuíram a responsabilidade pela atividade biológica apresentada pelo extrato cru.

Investigando o extrato etanólico do pó da semente da *Annona crassiflora*, SANTOS et al (1996), após avaliação cromatográfica em sílica gel 60 isolaram a Grossamida e a N-trans-caffeoyltyramina e acetogeninas que têm atividade antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária.

SANTOS et al, (1996), pesquisando o extrato etanólico do pó da semente da *Annona crassiflora* isolou a araticulim, uma acetogenina, bis-tetrahidrofuranica já conhecida, que apresentou atividade antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária..

Analisando o extrato etanólico das raízes da *Goniothalamus donnainensis* JIANG et al (1997), isolaram e identificaram dois pares epimericos de acetogeninas de anonacea, denominadas de goniodonina-trans e 34-epi-trans-goniodonina. Goniodonina -cis e 34-epi-cis-goniodonina, caracterizadas pela presença de uma  $\gamma$ -hidroximetil- $\gamma$ -lactona que apresentaram atividade citotóxica contra células neoplásicas.

Estudando o extrato das folhas da *Annona glabra* L. TRUONG et al, (1999), isolaram o composto TP1 que apresentou uma significativa atividade antibacteriana

KOTKAR et al, (2002) estudando flavonóide, tipo flavonol, do extrato das folhas da *Annona squamosa*, demonstraram que este composto tem ação antimicrobiana contra os microrganismos mais comuns de legumes e ação inseticida contra *Callosobruchus chinensis*.

Avaliando o extrato etanólico das folhas *Annona crassiflora* Mart. FURTADO & PIMENTA (2002), isolaram 02 alcalóides, sendo 01 aporfínico e outro do tipo oxaporfínico, não identificados, para os quais atribuem associação com as atividades citotóxica, antitumoral, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana.

SANTOS, et al, (2003), analisando o extrato etanólico da madeira da *Annona dioica* identificaram vários compostos alcalóides que apresentaram atividade antireumática e antidiarreica.

Avaliando a atividade citotóxica e anticancerígena de 27,7 $\mu$ g/l do extrato bruto da madeira da *Annona crassiflora* frente a *Artemia salina* GONÇALVES, (2006), isolou duas substâncias identificadas como dois alcalóides oxaporfínicos, Aterosperimidina e Liriodenina.

Examinando o extrato etanólico da semente da *Annona crassiflora* frente as larvas do mosquito *A. aegypti*, LIMA, et al, (2006), obteve um composto puro da fração ativa. Esta substância foi caracterizada como uma acetogenina, a rolicinina.

LUNA, et al, (2006), analisaram o extrato etanólico das folhas da *Annona muricata* e identificaram os compostos, annonacin, isoannonacin e goniothalamycin, acetogeninas que apresentaram atividades moluscicidas.

## 2.5 – MICROFLORA ENDODÔNTICA

Pesquisando a presença de bactéria WEIGER et al (1995), avaliaram 12 lesões periodontais induzidas endodônticamente e com a presença de fistula. Vinte dentes do total de 11 pacientes foram examinados. Observou-se a presença de microorganismos aeróbicos e anaeróbicos, dentre eles, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacilus*, *Pseudomonas*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Bacteroides*. Todas as amostras coletadas das fistulas e dos canais radiculares continham bactéria. Na maioria dos casos ocorreu a predominância de anaeróbicos estritos na microflora do canal radicular. Setenta e uma colônias foram detectadas nas lesões extra radiculares. Em nove casos, espécies encontradas no canal radicular estavam também presentes nas lesões extraradiculares. Das espécies detectadas nas fistulas, 14% a 100% também foram encontradas dentro do canal radicular.

GOMES et al (1996), estudaram a significância clínica da microflora dos canais radiculares, especialmente, associada com sinais e sintomas clínicos em 70 dentes permanentes, sendo que 49 apresentaram raízes simples e um canal. Foram isolados *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella melanogenica*, *Prevotella oralis*, *Eucobacterium aerofaciens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* e *Prevotella intermedia*.

SUNDQVIST et al (1998), averiguando análises microbiológicas de dentes com tratamento endodôntico falho e acompanhando o retratamento, avaliaram 54 canais de 44 dentes assintomáticos e que mostravam radiograficamente a presença de lesão óssea periapical. Os resultados demonstraram a presença de *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus parasanguis*, *Lactobacilus catenaforme*, *Candida albicans*, *S. intermedius*, *L. catenaforme*, *Eucabacterium alactoliticum*, *Propianobacterium acnes*, *P. micros*, *Streptococcus mitis*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *Streptococcus anginosus*, *Eucabacterium alactoliticum*, *Propionibacterium propionicum*, *Bacteroides gracilis* e *Enterococcus faecalis*.

Analisando infecções do canal radicular em dentes de camundongos convencionais (grupo 1) e livre de bactéria (germ-free) (grupo 2), SOBRINHO et al (1998), inocularam isoladamente ou associados as seguintes bactérias: *Porphyromonas endodontallis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eucabacterium lentum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Foi inoculado 25µl da amostra

contendo os microorganismos dentro do canal radicular do Incisivo central inferior do elemento de cada grupo, e em seguida todos os dentes foram restaurados provisoriamente. Cinco dias depois todos os dentes foram abertos e o conteúdo séptico retirado por cones de papel absorventes foi colocado numa placa contendo ágar sangue + hemina + menadiona. A placa foi incubada por 05 dias a 37<sup>0</sup>C em camara de anaerobiose e os resultados demonstraram crescimento de todos os microorganismos inoculados isoladamente em ambos os grupos estudados.

ROCHA et al (1998), realizaram um estudo bacteriológico das lesões periapicais avaliando o tecido perirradicular de 30 casos cirúrgicos os quais foram submetidos a exame microbiológico e histopatológico. Após a análise bacteriológica foram obtidas 137 cepas bacterianas das 30 lesões periapicais estudadas. Estavam presentes coccus Gram-positivos (anaeróbios estritos e facultativos), coccus Gram-negativos (anaeróbios estritos), Bacilos Gram-negativos (anaeróbios estritos e aeróbios estritas) e bacilos Gram-positivos (aeróbios estritos). Dentre essas espécies citadas existiu uma maior ocorrência de bactérias anaeróbias estritas 90 (65.7%). Destas, 64 (71,1 %) foram Cocos e Bacilos anaeróbios estritos Gram-negativos. Nas 30 culturas realizadas, foi observado que as lesões apresentavam infecções polimicrobianas. Em 22 (73,4%) dos casos houve associação de bactérias anaeróbias estritas e facultativas, enquanto em apenas 1 (3,3%) dos casos houve associação exclusiva de bactérias anaeróbias estritas. As infecções polimicrobianas foram representadas por no mínimo 02 ou no máximo 06 microrganismos isolados por lesão periapical.

Avaliando o estado microbiológico de dentes com canais radiculares obturados e presença de lesão periapical MOLLANDER, et al (1998), examinaram 100 dentes com periodontite apical certificada radiograficamente (grupo P) e 20 dentes sem sinais de patologia periapical (grupo T). Os resultados demonstraram a presença de uma microbiota em 68 dos 100 dentes examinados (grupo P) nos quais 117 espécies foram reconhecidas. Foram isoladas em 85% dos canais, uma ou duas espécies. Existiu uma predominância de anaeróbios facultativos Gram-positivos (69%). A maioria das espécies isoladas pertencia frequentemente ao grupo dos *Enterococcus*, os quais foram encontrados em 32 dentes. No grupo T, 13 espécies foram isoladas em 09 dos 20 dentes examinados, ocorrendo uma predominância dos anaeróbios facultativos Gram-positivos (84,6%). Nos canais radiculares dos dentes de ambos os grupos houve o crescimento de *Candida albicans*.

Pesquisando a flora microbiana em dentes de canais radiculares tratados e associados com lesões radiolúcidas assintomáticas periapicais, CHEUNG & HO (2001), investigaram 24 pacientes que não tinham recebido nenhuma terapia antibiótica até 03 meses. O resultado da análise microbiológica de 12 das 18 amostras (67%) mostrou a presença de microrganismos. Um total de 22 espécies foram identificadas. O número de espécies obtidas de cada amostra mudou de 0-6. Dentre os microrganismos, foram identificados o fungo (*Candida albicans*), *Porphyromonas assacarolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, porém, *Streptococcus*, *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Pseudomonas ssp.*, foram os mais frequentemente reconhecidos.

Investigando a identificação molecular de microrganismos em infecções endodônticas, ROLPH et al (2001) avaliaram 41 amostras de 24 pacientes. Os pacientes submetidos ao exame apresentaram periodontite perirradicular crônica com polpa necrosada (casos novos) ou o tratamento de canal foi julgado apresentando falha (casos refratários). Os resultados demonstraram no grupo de casos novos a presença de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Prevotella* e *Pseudomonas*. Os casos refratários apresentaram *Capnocytofaga*, *Cytofaga*, *Eucabacterium*, *Selenomonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Solobacterium*, *Veillonella* e sub-grupos *Clostridiaceae*, *Esporumosa* e *Firmicutes*.

PETERS, et al (2002), estudando combinações de espécies de bactérias nas infecções endodônticas analisaram amostras de canais radiculares de 58 pacientes através de exames microbiológicos. Todos os dentes estavam assintomáticos ao teste de sensibilidade, não tinham recebido tratamento endodôntica anterior e mostravam evidencia radiográfica de perda óssea periapical. Os resultados demonstraram que todas as amostras continham microrganismos cultivados. O número de espécie por canal foi de 4-7. De todas as espécies isoladas, 87% foram de anaeróbios estritos. As espécies bacterianas mais prevalentes foram a *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* e a *Actinomyces odonticulus*, presentes respectivamente em 33, 29 e 19% das culturas dos canais examinados. Outras espécies também estiveram presentes, dentre elas *Prevotella oralis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella melanogenica*, *Bacteroides ssp.*, *Veillonella* e *Stafylococcus spp.*

Avaliando a prevalência de microrganismos em dentes decíduos de humanos com polpa necrosada e lesão periapical crônica, PAZELI, et al (2003), examinaram 31 canais radiculares. Os resultados mostraram que os microrganismos anaeróbios foram quantificados em 96,8 % (30 canais) dos casos, os bacilos pigmentados de negro (BPD) em 35.5% (11 casos), os aeróbios em 29 canais radiculares (93.5%) com o *Streptococcus* presente em 30 canais (96,8%) e o *Streptococcus mutans* quantificado em 15 canais (48.4%). Desse modo, pôde-se concluir que a infecção em canais radiculares de dentes decíduos humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical é polimicrobiana, com grande quantidade de microorganismos e maior prevalência de *Streptococcus* e microrganismos anaeróbios.

PINHEIRO et al (2003), avaliaram 60 canais radiculares em dente de humanos, objetivando encontrar microorganismos. Quarenta e um destes dentes apresentavam necrose pulpar (infecção primária) e 19 apresentavam tratamento endodôntico falho (infecção secundária) com evidência radiográfica de periodontite apical. Os resultados demonstraram um total de 224 microrganismos isolados pertencentes a 56 espécies bacterianas diferentes. Cada canal apresentou o máximo de 10 espécies bacterianas. Das bactérias isoladas 70% foram anaeróbio estrito ou microaerófilo. A microflora do canal não tratado dos dentes com periodontite apical foi mista, compreendendo Gram-negativos e Gram-positivos e em sua maioria microrganismos anaeróbios contendo mais de 03 espécies por canal. Por outro lado anaeróbios facultativos e bactérias Gram-positivas predominaram nos canais com falhas na obturação. A bactéria Gram-negativa esteve presente em 32% das espécies isoladas dos 60 canais enquanto as bactérias Gram-positivas aconteceram em 67.4% do total isolado. As bactérias mais frequentemente reconhecidas dos canais radiculares foram: *Peptostreptococcus* (58.3%), *Streptococcus* (53.3%), *Prevotella* (31.7%), *Enterococcus* (23.3%), *Gemella* (13.3%), *Staphylococcus* (13.3%), *Actinomyces* (11.7%), *Porphyromonas* (11.7%), *Clostridium* 10%), *Eucabacterium* (10%), *Veillonella* (10%), *Propionibacterium* (6.7%), *Bacteroides* (5%), *Cardiobacterium* (3.3%) e *Tissierella* (3.3%). Apareceram também, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Neiseria ssp.*, *Capnocytophaga ssp.* e *Tissierella praecuta*.

SAINI, et al (2004), afirmam em um estudo microbiológico que as infecções cirúrgicas são em sua maioria polimicrobianas, envolvendo aeróbios e anaeróbios. Cento e setenta casos compreendendo: abscessos (51), peritonite secundária (25), facititis

necrosante (22) e ferida de tecido desvitalizado (19), foram estudados. Todas as infecções apresentaram uma natureza polimicrobiana e os microorganismos mais comuns isolados foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragillis* e *Peptostreptococcus ssp.* Apareceram também: *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus*, *Proteus ssp.*, *Veillonella ssp.*, *Eucabacterium ssp.*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium ssp.*, *Prevotella melanogenica*, *Fusobacterium* e *Mobiluncus ssp.*

LEONARDO., et al (2004), estudaram a importância da endotoxina bacteriana (LPS) na endodontia. Esse trabalho consistiu numa revisão literária abordando as atividades biológicas da endotoxina bacteriana (LPS) e a importância de sua inativação durante o tratamento de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical em virtude dos microorganismos anaeróbios gram negativos aí presentes possuírem esta toxina nas suas paredes celulares. Isto é muito importante porque esta endotoxina é liberada quando da multiplicação ou morte bacteriana, causando uma série de efeitos biológicos os quais conduzem para uma reação inflamatória e reabsorção dos tecidos mineralizados. Além de causar uma reação inflamatória a endotoxina (LPS) adere irreversivelmente para atuar nos tecidos mineralizados como um potente estimulador de reabsorção óssea, atuando na síntese e liberação de citocinas as quais ativam os osteoclastos, tais como IL-1 e TNF, e estimulam a liberação de prostaglandinas E2 que também influenciam os osteoclastos. Portanto, afirmam os autores, que a endotoxina bacteriana (LPS) está presente em todos os dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica visível radiograficamente, tendo uma função importante na gênese e manutenção da lesão periapical devido a indução da inflamação e da reabsorção óssea.

Estudando a redução e persistência bacteriana após tratamentos endodônticos procedidos, SAKAMOTO et al (2007), introduziam uma lima tipo K com uma guia cortante no canal radicular até 1mm aquém do ápice do dente de acordo com dados radiográficos, e um suave movimento de limagem foi aplicado. Depois 02 cones de papel consecutivamente foram colocados no mesmo nível, para remover o líquido do canal radicular. A lima cortada e os cones de papel foram transferidos para um meio apropriado de cultura, amostra (S1). Depois todos os canais foram preparados por movimentos rotatórios. Em seguida amostras foram colhidas do canal como descrito anteriormente, amostra (S2). Após a colocação da pasta de hidróxido de cálcio no interior do canal, o dente foi restaurado provisoriamente. Em atendimento posterior,



depois de se retirar a restauração provisória, procedeu-se a remoção da pasta de hidróxido de cálcio, e em seguida foi obtida a última amostra do interior do canal radicular (S3). Depois da identificação molecular realizada os resultados demonstraram que os canais das amostras pós instrumentação (S2) e pós medicação (S3) apresentaram em 15 casos resultados negativos e nos outros casos apresentaram uma significativa redução de microrganismos entre 99,67% e 99,85% respectivamente em relação a amostra (S1). Afirmam os autores que a bactéria pode persistir no canal radicular após os procedimentos de desinfecção levando o tratamento ao insucesso

## **2.6 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS DROGAS UTILIZADAS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS**

ÁVILA-CAMPOS et al (1993), estudando populações resistentes de *Bacteróides fragillis* obtidas de intestino humano, avaliaram a sensibilidade da bactéria para a clindamicina, metronidazol, penicilina G e bicloreto de mercúrio. Os MICs para os quatro antimicrobianos foram determinados pelo método de diluição em agar. A concentração das drogas utilizadas foram: clindamicina (4µg/mL, metronidazol (16µg/mL), penicilina G (16µg/mL) bicloreto de mercúrio (4µg/mL). Os resultados demonstraram que todas as cepas bacterianas foram sensíveis as drogas testadas e os MICs: clindamicina 0,25ug/mL, metronidazol (2µg/mL), penicilina G (16µg/mL) e bicloreto de mercúrio (16µg/mL). Os autores definem o MIC como a menor concentração de cada agente antimicrobiano capaz de inibir macroscopicamente o crescimento bacteriano.

Para avaliação da atividade antibacteriana de cimentos de endodônticos contendo hidróxido de cálcio ou óxido de zinco frente ao *Enterococcus faecalis* in vitro, FUSS et al (1997), utilizaram os cimentos CRCS, Sealapex (hidróxido de cálcio) e Roth's (óxido de zinco), os quais depois de preparados, foram colocados numa placa que receberem inoculação de 10 µl de suspensão de *Enterococcus faecalis*. Após incubação de 1 hora a 37<sup>0</sup>C a evaporação da suspensão líquida foi evidente e garantiu um direto contato entre todas as bactérias e os materiais testados (grupo A). No grupo B, o inoculo proveniente do grupo A foi introduzido em outras placas, incubado e depois foi associado aos cimentos. Depois as amostras foram deixadas por 24 hs (

amostra 24 hs – grupos A-B), e por 07 dias ( amostra 7 dias – grupos A e B) a 37<sup>0</sup>C. Os resultados demonstraram que na amostra 24 horas, no grupo A onde o inóculo foi associado a superfície dos cimentos, os três materiais mostraram completa inibição de crescimento bacteriano. Na amostra 7 dias (grupo A), somente os cimentos Roth's e Sealapex inibiram totalmente o crescimento bacteriano. No entanto, no grupo B, amostra 24 horas, somente o cimento Roth's mostrou inibição bacteriana, enquanto que, na amostra 7 dias (grupo B), apenas o sealapex mostrou inibição.

BOULOS em (1993), verificando o tratamento pelo Fluconazol de pacientes imuno-comprometidos com graves infecções fúngicas, avaliou 108 pacientes. As doses iniciais variaram de 50 a mais de 400 mg/dia. Dos 108 pacientes, 57 (52.8%) tinham criptococose, 45 (41.7%) candidiase e 6 ( 5.5%) outras infecções fúngicas, sendo que 66% dos pacientes eram portadores de AIDS. Dos 57 pacientes com criptococose, houve acometimento do SNC em 52 (91.2%). Trinta e nove de 43 pacientes com criptococose (90.7%) e 36 de 39 dos portadores de candidiase (92.3%), curaram ou tiveram boa evolução clínica. A erradicação do fungo ocorreu em 19 de 30 casos com criptococose (63%) e em 21 de 26 casos com candidiase (80.7%) que puderam ser avaliados.

Demonstrando a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e cabapenens, GALES et al (1997), analisaram 569 amostras clínicas isoladas de pacientes. A distribuição das espécies foram: *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp* e outros gram negativos. Os antimicrobianos testados foram: ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, grepafloxacina, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem e biapenem. Depois da análise microbiológica feita pelo teste de diluição e caldo, observou-se que todas as espécies bacterianas foram sensíveis a todas as drogas testadas. No que se refere as fluoroquinolonas, esses compostos promovem sua ação antimicrobiana inibindo a enzima DNA girase bacteriana. Nesse estudo todas as espécies bacterianas foram sensíveis as fluoroquinolonas. Obteve-se uma concentração inibitória mínima (MIC) que variou de 0.03µg/mL para a Grepofloxacina e >4µg/mL para a Ofloxacina, Grepafloxacina e a Levofloxacina.

ESTRELA et al (1998), determinaram *in vitro* o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio em contato direto contra as bactérias *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus sp*. Após análise por meio de estereomicroscopia, observou-se que o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio ocorreu após 12 horas no *M. luteus* e *Fusobacterium nucleatum*, 24 horas no *Streptococcus sp*, 48 horas na *Escherichia coli* e 72 horas no *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

LOTUFO et al (2001), analisando a sensibilidade do *Bacteroides forsythus* a antimicrobianos em pacientes portadores de periodontite, afirmam que essas bactérias além de vários mecanismos de virulência produzem as enzimas tripsina e sialidase as quais podem ser importantes na patogênese da doença periodontal. Foram realizados testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* (técnica de diluição em ágar) para 105 cepas de *Bacteroides forsythus*. De acordo com o teste realizado, o microrganismo demonstrou ser sensível ao metronidazol em cem por cento (100%) das cepas testadas.

Investigando a atividade de agentes antibacterianos endodônticos contra bactéria anaeróbias selecionadas, FERREIRA, et al (2002), utilizaram 4 agentes antibacterianos: solução aquosa de hidróxido de cálcio a 10%, digluconato de clorexidina a 2%, detergente de mamona a 10% e paramonoclofenol canforado (PMCC). Os microorganismos utilizados foram: *Prevotella nigrescen*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e atividade bactericida. Os resultados demonstraram que todos os agentes antimicrobianos apresentaram atividade, variando para as diferentes espécies bacterianas, não havendo diferenças entre os caldos utilizados. O digluconato de clorexidina demonstrou a melhor eficiência, com os menores CIMs, seguido pelo detergente de mamona, PMCC e Hidróxido de Cálcio. O *Clostridium perfringens* e o *Bacteroides fragilis* foram às espécies mais resistentes aos agentes.

Para verificar *in vitro* o tempo necessário para o hidróxido de cálcio eliminar 5 microrganismos de canais infectados, ESTRELA et al (2003), utilizaram 168 dentes anteriores de humanos. Foram utilizadas 5 espécies microbianas, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Suspensões dessas bactérias foram utilizadas puras ou mistas. O resultado indicou uma ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio em 60 dias.

Para observar o controle de microrganismos por irrigantes endodônticos *in vitro* ESTRELA et al (2003), empregaram 4 espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* e as soluções irrigantes: NaOCl a 1%, digluconato de clorexidina a 2%, solução aquosa de Ca(OH)<sub>2</sub>, solução de Ca(OH)<sub>2</sub> + detergente. Depois de obtidas as suspensões puras e mistas destes microrganismos, determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e testada a ação antimicrobiana após diferentes tempos de exposição direta (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) ante os microrganismos, os resultados revelaram que o hipoclorito a 1% apresentou MIC igual a 0.1% para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida. albicans* e igual a 1% para o *Bacillus. subtilis*, e cultura mista. A clorexidina a 2% mostrou CIM igual a 0,000002% para o *Staphylococcus aureus*, 0,02 para *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans* e a cultura mista e 0,002 para *Pseudomonas.aeruginosa*. A solução de hidróxido de cálcio a 1% apresentou CIM superior a 1% para todos os microrganismos testados, com exceção da *Pseudomonas. aeruginosa*, cujo CIM foi igual a 1%. A solução de hidróxido de cálcio + detergente mostrou CIM igual a 4,5 mL para *Staphylococcus. aureus*, *Pseudomonas. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida. albicans* e a cultura mista e superior a 4,5 mL para o *Enterococcus faecalis*. No teste de exposição direta o hipoclorito de sódio a 1% apresentou melhor efeito antibacteriano para todos os microrganismos em todos os períodos experimentais. A clorexidina a 2% foi efetiva sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus. faecalis* e *Candida albicans* em todos os períodos, e inefetivo sobre *Pseudomonas. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e sobre cultura mista. As outras soluções não mostraram resultados satisfatórios.

JACINTO et al (2003), analisaram canais infectados de dentes sintomáticos e assintomáticos com periodontite periapical e sensibilidade antimicrobiana de algumas bactérias anaeróbias. Foram utilizados 48 canais radiculares de 48 pacientes, sendo 29 sintomáticos e 19 assintomáticos. Um total de 218 isolados oriundos de 48 diferentes espécies microbianas de 19 gêneros diferentes foram obtidos. Os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados com os antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + clavulonato, clindamicina, metronidazol, benzilpenicilina, eritromicina, cefaclor e azitromicina, as quais foram testadas frente a *Fusobacterium necroforum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus e Prevotella..* Os resultados demonstraram que canais radiculares de dentes sintomáticos

abrigaram principalmente microrganismos anaeróbios estritos e um maior número de espécies bacterianas do que os dentes assintomáticos. Mais de 70% das bactérias isoladas eram anaeróbias estritas. Apenas a Amoxicilina, amoxicilina + clavulonato e ceflacor foram efetivos contra todas espécies testadas.

PINHEIRO et al (2004), pesquisaram a sensibilidade de 21 *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares obturados de dentes com lesão apical. Os seguintes antimicrobianos foram testados: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulônico, eritromicina, azitromicina, vancomicina, clorafenicol, doxiciclina, ciprofloxacina e moxifloxacina. Foram realizados os testes de sensibilidade antimicrobiana com determinação da concentração inibitória mínima. As espécies foram sensíveis a benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulônico, vancomicina e moxifloxacina. Este último foi o antibiótico mais ativo contra o *Enterococcus faecalis*. Dos antimicrobianos testados os menos ativos foram a eritromicina (28,5%) e a azitromicina (14,2%).

ITO et al (2004) analisaram a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos de cepas de *Candida ssp.* isoladas de pacientes com periodontite crônica e de indivíduos controle. Um total de 39 isolados de *Candida albicans*, 9 de *Candida tropicalis*, 2 de *Candida glabrata* e 5 de *Candida ssp.* de indivíduos controle foram testadas para sensibilidade ante drogas antifúngicas. Dos pacientes acometidos com periodontites, 30 de *Candida albicans*, 2 de *Candida tropicalis* e 3 de *Candida glabrata* foram testados. As amostras fúngicas foram submetidas aos testes de sensibilidade para os agentes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, miconazol, cetoconazol e 5 fluorocitosina. Uma amostra de *C. glabrata* de pacientes do grupo controle foi resistente ao cetoconazol e uma *Candida ssp.* mostrou-se resistente a anfotericina B, cetoconazol e miconazol. Dentre as amostras do grupo com periodontite, uma amostra de *Candida albicans* foi resistente a 5-fluorocitosina e ao cetoconazol. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que o fluconazol foi o fármaco mais eficaz contra todas espécies de *Candidas* estudadas.

CROCCO et al (2004), identificaram espécies de *Candida* e sua sensibilidade antifúngica *in vitro* estudando 100 pacientes com candidíase superficial. Após o isolamento e identificação das espécies foram realizados os testes de sensibilidade ante as drogas antifúngicas: cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) para cada antifúngico. Os

resultados demonstraram que a *Candida albicans* foi isolada em 76% dos materiais, *Candida krusei* em 19% e *Candida tropicalis* em 1%. A *C. albicans* foi a espécie mais observada e a maioria das amostras de *Candida* mostraram-se sensíveis aos antifúngicos.

AMORIM et al (2004), averiguando a sensibilidade de alguns microrganismos orais frente a soluções de digluconato de clorexidina a 20% e paramonoclorofenol (PMC) a 98% através da concentração inibitória mínima (CIM), utilizaram espécies de *Porphyromonas gengivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella denticola*, *Prevotella melanogenica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas foi determinada pelo método de diluição em ágar, os resultados demonstraram que o CIM da clorexidina variou de 2.67 a 80.00 µg/mL e o MIC do PMC variou de 46.67 a 213.33 µg/mL. O mais alto valor de MIC do PMC foi frente ao *Enterococcus faecalis* (213.33 µg/mL) e o mais alto valor de CIM da clorexidina foi para a *Pseudomonas aeruginosa* (80.0 µg/mL). Devido os CIMs terem sido mais baixos, o digluconato de clorexidina, pareceu ser mais efetivo do que o PMC frente aos microorganismos testados.

A eficácia antimicrobiana da clorexidina e duas formulações de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) contra o *Enterococcus faecalis*, foram avaliadas por SCHAFFER & BROSSMANN (2005) em 30 dentes unirradiculados extraídos de humanos com canais únicos os quais foram instrumentados, e divididos em 3 grupos de 10 cada. Depois, o inóculo de *Enterococcus faecalis* foi inserido dentro do canal radicular. Após o período de incubação, o inóculo foi removido e os canais radiculares foram preenchidos com um dos três deferentes desinfetantes: pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ , clorexidina (CHX) a 2% e mistura de CHX e pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ . Dez dentes controle foram preenchidos com água rigorosamente padronizada. Os resultados revelaram que a CHX foi significativamente mais efetiva contra o *Enterococcus faecalis* do que a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  ou a mistura de CHX com a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  e que não existiu nenhum aumento na eficiência quando a CHX foi adicionada a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Procedendo a utilização sistêmica do metronidazol no tratamento da periodontite crônica, VERGANI et al (2004), realizaram um estudo utilizando a avaliação clínica, enzimática e microbiológica. Depois da avaliação microbiológica realizada por meio do

teste enzimática (“Pocket Watch”) e clínica dos 12 pacientes de 3 grupos os quais foram assim tratados: grupo I – 22 sítios, foram submetidos somente à raspagem e alisamento radicular (RAR). Grupo II - 30 sítios, recebeu RAR e 250 mg de metronidazol e o grupo III – 31 sítios, foi tratado somente com metronidazol. Os resultados demonstraram que não foram observados os efeitos adicionais do uso sistêmico do metronidazol relativo à condição microbiológica dos pacientes, portanto a utilização desta droga em pacientes com doença periodontal crônica parece não ter justificativa.

VIANNA et al (2005), avaliaram a sensibilidade de patógenos endodônticos ao hidróxido de cálcio combinado com diferentes veículos. Foram utilizadas pastas do pó de hidróxido de cálcio associado aos seguintes veículos: água estéril, glicerina, paramonoclorofenolcanforado (PMCC), PMCC + glicerina, polietilenoglicol, PMCC + polietilenoglicol. Os seguintes microorganismos foram utilizados: *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gengivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*. Os resultados mostraram que o tempo para as pastas inibirem os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos foi de 6 a 24 horas, enquanto que os microrganismos anaeróbios estritos foram inibidos dentro de 30 segundos a 5 minutos. O escore da resistência dos microrganismos testados ante as drogas nesse estudo, foi o seguinte: *Enterococcus faecalis* > *Candida albicans* > *Staphylococcus aureus* > *Porphyromonas gengivalis* > *Porphyromonas endodontalis* = *Prevotella intermedia*.

RIBEIRO et al (2006), compararam o efeito antimicrobiano do agregado trióxido mineral (MTA), hidróxido de cálcio e do cimento Portland sobre 4 cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados evidenciaram que o MTA e o cimento Portland inibiram o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e o hidróxido de cálcio foi efetivo contra a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Bacteroides fragilis*. Em atmosfera aeróbica o *Enterococcus faecalis* foi sensível ao MTA e ao hidróxido de cálcio e a *Escherichia coli* somente foi sensível ao hidróxido de cálcio. Sob condições de anaerobiose os materiais não foram efetivos contra o *Enterococcus faecalis* e a *Escherichia coli*.

PANZARINI et al (2006), observaram e compararam o emprego do hidróxido de cálcio, metronidazol e a associação de ambos no tratamento de dentes de cães com

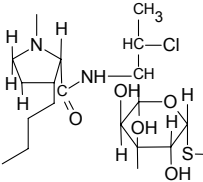
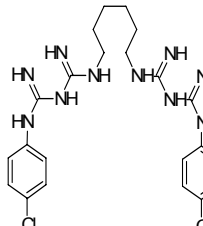
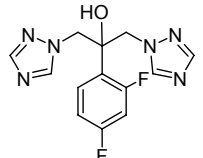
lesões periapicais crônicas pós tratamento endodôntico, como curativo do canal radicular. Os dentes foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o curativo de demora empregado: Grupo I – controle, sem curativo de demora. Grupo II – hidróxido de cálcio. Grupo III – metronidazol. Grupo IV – hidróxido de cálcio associado ao metronidazol. Passados 15 dias os canais radiculares foram obturados com cimento Fill canal e após 90 dias os animais foram sacrificados e as amostras processadas para análise histológica. Os resultados revelaram que o hidróxido de cálcio forneceu resultados significativamente superiores comparado aos outros grupos experimentais. Também, os resultados da associação do metronidazol e hidróxido de cálcio foram semelhantes àqueles observados para o grupo metronidazol. O pior resultado obtido foi para o grupo dos canais radiculares sem curativo (controle).

AMORIM et al, (2006), Analisaram a atividade antimicrobiana de diferentes pastas obturadoras do canal radicular utilizadas em odontopediatria. Os materiais testados foram pasta Guedes-Pinto (iodofórmio + rifocort + paramonoclofenol canforado), pasta de óxido de zinco e eugenol (ZOEP), pasta de hidróxido de cálcio + propilenoglicol, pasta CTZP (clorafenicol + cloreto de tetraciclina + óxido de zinco e eugenol) e Vitapex. Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Foram utilizados 2 métodos de avaliação microbiológica, o de exposição direta e o teste de difusão em ágar. Os resultados demonstraram que o efeito antimicrobiano completo obtido pelas pastas por meio do teste de exposição direta, foi efetivo após 24 horas frente a todos microrganismos. No teste por difusão em ágar, todos os materiais induziram a formação de zonas de inibição que variaram de 6.0 a 39.0 mm, exceto o Vitapex.

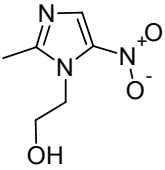
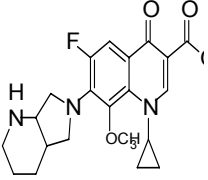
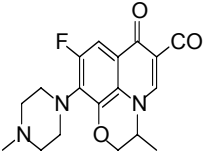
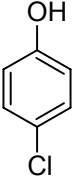
FERNANDES JÚNIOR et al (2006), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de Própolis de *Apis mellifera* obtidas de três regiões do Brasil (Botucatu, Urubici e Mossoró), frente aos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. De um modo geral, todas as cepas bacterianas e fúngicas foram sensíveis aos amostras testadas. No entanto o *Enterococcus faecalis* mostrou-se mais sensível do que a *Candida albicans* e esta mais sensível do que a *Pseudomonas aeruginosa*, levando-se em consideração os resultados das concentrações inibitória mínimas (CIMs) obtidas.



**Tabela 4.** Dados etnofarmacológicos de drogas utilizadas nas infecções endodônticas

DROGA	ESTRUTURA	USO MEDICINAL	MICROORGANISMO	CIM (µg/mL)	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Bicloreto de Mercúrio	Cl—Hg—Cl	Antimicrobiano	<i>Bacteróides fragilis</i>	16	ÁVILA-CAMPOS et al 1993
Clindamicina		Antimicrobiano	<i>Bacteróides fragilis</i>	0,25	ÁVILA-CAMPOS et al 1993
Clorexidina		Antimicrobiano	<i>Prevotella nigrescens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacteróides fragilis</i>	0,30 0,30 2,44 9,75	FERREIRA et al, 2002
Fluconazol		Antifúngi co	<i>Candida albicans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida albicans</i>	Não citado <32 - >64 0,5	BOULOS, 1993. ITO et al, 2004 CROCCO et al, 2004
Hidróxido de Cálcio	OH—Ca—OH	Antimicrobiano	<i>Micrococcus lutens</i> <i>Stafilococcus aureus</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus sp</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacteróides fragilis</i> <i>Stafilococcus aureus,</i> <i>Enterococcus faecalis.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa,</i> <i>Bacilo subtilis</i> <i>Candida albicans</i>	Não citado Não citado Não citado 781,25 781,25 6250,00 3125,00 > 1% > 1% 1% > 1% > 1%	ESTRELA, et al 1998    FERREIRA et al, 1999    ESTRELA et al, 2003

## Continuação da tabela 4.

Metronidazol		Antimicrobiano	<i>Bacteróides fragilis</i> <i>Bacteróides forsytus</i>	2 e 4 Não citado	ÁVILA-CAMPOS et al 1993 e LOTUFO et al, 2001.
Moxifloxacina		Antimicrobiano	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,5	PINHEIRO et al, 2004.
M T A	Continuação da tabela 4. Não citado	Antimicrobiano	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacteróides fragilis</i>	Não citado	RIBEIRO et al, 2006.
Ofloxacina		Antimicrobiano	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	0,12 -> 4	GALES, et al,1997.
Paramonoclorofenol (PMC)		Antimicrobiano	<i>Prevotella nigrescens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacteróides fragilis</i>	340,00 85,00 680,00 340,00	FERREIRA et al, 2002.
Paramonoclorofenol (PMC)	Já citado		<i>P.aeruginosa</i> <i>E.faecalis</i>	126,67 213,33	
Clorexidina	Já citada	Antimicrobiano	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Prevotella intermédia</i> <i>P.Denticola</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	194,17 194,17 174,76 194,17	AMORIM et al, 2004.
Própolis	Não citado	Antimicrobiano E antifúngico	<i>Stafilococcus aureus</i> , <i>Enterococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i>	0,3 – 1,5 1,1 – 3,8 7,0 – 8,5 5,3 – 6,0 2,1 – 4,4	FERNANDES JUNIOR et al 2006.

## 2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS E PRODUTOS NATURAIS.

Estudando as atividades biológicas da *Annona glabra*, PADMAJA, et al (1995), avaliaram o efeito antimicrobiano, antifúngico, inseticida, esporicida e citotóxico do

extrato hexânico do caule (ANG) cromatografado em coluna e a recristalização levou ao ácido kaur-16-en-19) como um cristal incolor(2g). A atividade antibacteriana do ANG e do composto 1 foi avaliada e também determinada a concentração inibitória mínima frente as bactérias *Staphylococcus piogênico*, *Bacillus brevis*, *Salmonella tiphy*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogena*, *Pseudomonas piocianeae* e *Proteus vulgaris* e frente as espécies fúngicas, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Tricofiton mentagrofito*, *Micrósporo gipseo* e *Epidermofito floccosum*. *Staphylococcus piogênico* e *Pseudomonas piocianeae* foram altamente sensíveis ao ANG a 500ug/d e a atividade do composto 1 foi comparada a gentamicina contra *Staphylococcus piogênico* e *Pseudomonas pioceanae*. A atividade antifúngica demonstrou que o ANG inibiu o crescimento de *Aspergillus niger*, *Penicillium ssp.*, *Tricofito metagrofito*, *Micrósporo gipseum* e *Epidermofito flocosum* numa concentra,ao de 500ug/m. No entanto a *Candida albicans* foi resistente a esta concentração. O composto 1 inibiu o crescimento de *Aspergilos*, *Penicillium* e *Tricofiton* a 50ug/ml, e foi inibidor para *Candida albicans* a 100ug/ml.

Investigando a atividade antibacteriana de extratos de plantas, fitofármacos e antibióticos frente a bactérias sensíveis e resistentes, NASCIMENTO et al (2000), utilizaram os estratos de plantas cujos nomes populares são: tomilho, alecrim, cravo da Índia, jambolão, erva cidreira, romã, goiaba, sálvia, manjerição e mil folhas. Estes extratos foram avaliados frente a 14 espécies microbianas: 1 levedura ( *Candida albicans*), 5 bactérias sensíveis (*E. aureus*, *Salmonella coleraesus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacilo subtilis*, *Proteus ssp.*) e 8 bactérias resistentes a antibióticos de ambiente hospitalar ( *K. pneumoniae*, *Shigella ssp.*, *Proteus ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *E. aureus*).A maioria dos extratos das plantas foram efetivos para todas as espécies bacterianas testadas dentre elas, *Candida albicans* (50%) (Erva cidreira, Romã,Sálvia, manjerição e mil folhas) *Pseudomonas aeruginosa* (50%) (Alecrim, Jambolão, Erva cidreira, Goiaba, Sálvia e MiL Folhas). e *Pseudomonas aeruginosa* resistente (70%) (Alecrim,Erva cidreira, Romã, Goiaba, Sálvia, Manjerição e Mil folhas).

GEBARA et al (2002), avaliaram a atividade do extrato de própolis contra bactérias nas doenças periodontais. Nesse estudo utilizou-se o extrato etanólico de própolis e as seguintes espécies bacterianas: *Prevotella intermedia*, *Prevotella melanogenica*, *Porphyromonas gengivalis*, *Actinobacillus actinomicetemcomitans*,

*Capnocytophaga gingivallis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Pelo valor de CIM as bactérias mais sensíveis foram; *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella melanogenica* as quais apresentaram o CIM de 0.25ug/mL. As mais resistentes foram, *Candida albicans*, (CIM=12ug/mL) e *E.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (CIM=14ug/mL), no entanto todas as bactérias foram inibidas pela ação antimicrobiana do extrato de própolis.

CELOTTO et al (2003), analisando a atividade antimicrobiana in vitro de extratos crus de três espécies de *Miconia* (*M. albicans*, *M. rubiginosa*, *M. stenostachia*), frente a 4 bactérias gram - positivas, *Staphylococcus aureus*, *E. saprofiticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, e seis bactérias gram – negativas, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiela pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, e o fungo *Candida albicans*, demonstraram pela medição dos halos de inibição em torno dos poços criados e preenchidos com a solução do extrato nas placas de ágar inoculadas pelos microorganismos, que o *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*, foram resistentes a todos os extratos. No entanto foi ativo contra todas as outras espécies, inclusive a *Candida albicans*.

SARTORATTO et al (2004), averiguaram a composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas (*Menta piperita*, *M. spicata*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *O. applii*, *Aloysia triphylla*, *Ocimum gratissimum* e *O. basilicum*) usadas no Brasil frente aos microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Rodococcus equi*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *E. epidermis*, *Escherichia coli*, *Bacilo subitillis*, *Enterococcus faecium* e *Candida albicans*. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de diluição e os resultados indicam a efetividade destes óleos essenciais (CIM= 0.05-0.50mg/ml) contra *Enterococcus faecium* e *Salmonella choleraesuis*. *A. triphylla* e *O. basilicum* apresentaram inibição moderada (CIM=0.6-1.50mg/ml) contra *E. aureus* enquanto apenas a *A. triphylla* e *M. piperita* foram capazes de inibir moderadamente a *Candida Albicans* (CIM= 0.80 e 0.74mg/ml) respectivamente.

FERREIRA et al (2004), investigando a atividade antimicrobiana das espécies brasileiras da *Drosera* (*D.commmunis*, *D. montana*, *D. brevifolia*, *D. villosa* var.

*gramogolensis*, *D. villosa* var. *villosa*, *Drosera* sp.1, e *Drosera* sp.2 ) frente aos microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. Obteve os melhores resultados com os extratos de *D. montana* e *D. commmmmmunis*. Algumas bactérias gram negativas foram resistentes a todos os extratos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*), entretanto a *Cândida albicans* foi sensível a pelo menos 1 extrato de cada espécie.

LIMA et al (2005) analisaram a atividade de algumas plantas medicinais brasileiras. Vinte e cinco espécies de 14 famílias de plantas foram selecionadas para um ensaio de atividade anti-bacteriano e 49 extratos foram preparados e testados frente a *Escherichia coli*, a uma cepa sensível de *Staphylococcus aureus* e uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a Fluorquinolona e a macrolídeo. Todas as plantas estudadas mostraram atividade inibitória para a cepa resistente de *Staphylococcus aureus* e somente 7 foram ativas contra a espécie sensível de *Staphylococcus aureus* e nenhuma atividade antimicrobiana contra a *Escherichia coli*. Dentre as espécies de plantas avaliadas, as *Annonáceas*: *Annona crassiflora* (extrato etanólico da semente) mostrou total inibição para as 3 cepas de *Staphylococcus aureus*, entretanto o extrato da folha e do fruto e o extrato da casca do fruto da *Annona salzmanii*, só foram efetivos contra as espécies de *Staphylococcus aureus* resistentes, no entanto, a *Annona muricata* (extrato etanólico da folha) mostrou efetividade antibacteriana apenas frente a cepa sensível do *Staphylococcus aureus*.

SILVEIRA et al (2005), avaliaram a atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*, duas espécies da família *Palmae*. Para o teste de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e gram – negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Foram testados os extratos etanólicos brutos do epicarpo/mesocarpo de *S. oleracea* e de *M. vinifera*, o extrato hexânico das amêndoas de *S. oleracea*, as partições hexânicas e em acetato de etila do epicarpo/mesocarpo de *S. oleracea*, do epicarpo/mesocarpo e mesocarpo/endocarpo de *M. vinifera*, na concentração de 100ug/ml. Ficou evidenciado que os extratos lipofílicos de *S. oleracea* (partição em hexano do epicarpo/mesocarpo dos frutos e extrato hexânico das amêndoas) apresentaram os melhores percentuais de inibição para as cepas Gram-negativas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A partição em hexano

também apresentou o maior percentual de inibição para *Staphylococcus aureus*. Nenhuma das amostras testadas de *S. oleracea* foi capaz de inibir significativamente a cepa de *Enterococcus faecalis*. As partições em hexano e em acetato de etila do mesocarpo/endocarpo de *M.vinifera* foram altamente inibitórias para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, mas não foram capazes de inibir significativamente a cepa de *Escherichia coli*. O extrato etanólico bruto do epicarpo/mesocarpo de *M.vinifera* inibiu significativamente apenas as cepas Gram-negativas. As partições lipofílicas do epicarpo/endocarpo de *M.vinifera* foram mais inibitórias para a cepa de *S. aureus*. Nenhuma das amostras testadas foi capaz de inibir significativamente a cepa de *Enterococcus faecalis*.

VIEIRA et al (2005), estudaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e dos extratos obtidos por partição do extrato bruto da *Struthanthus vulgaris* (erva do passarinho) frente as bactérias: *Bacillus cereus*, *Baillus. subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus. aureus*, *S. epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* e as leveduras *Candida. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. O sobrenadante do extrato etanólico produziu os maiores halos de inibição (28mm), entre as bactérias atingidas estava a *Pseudomonas aeruginosa*, porém essa amostra não demonstrou atividade antimicrobiana contra as leveduras, dentre elas a *Candida. albicans*. Da amostra de EHC e das frações F1,F2,F3 e F4 testadas ante o *Bacillus cereus* (Gram-positivo) e *Pseudomonas. aeruginosa* (Gram-negativa) os maiores halos de inibição foram conseguidos com a fração F3 butanólica.

Realizando um estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., *Fabaceae* (*Leguminosae*), VIRTUOSO et al (2005), utilizaram a fração hexânica (FHEX) do extrato etanólico bruto (EB). A análise antimicrobiana foi feita frente aos microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados demonstraram que ambas as frações testadas (EB) e (FHEX) apresentaram alguma efetividade apenas frente ao *S. aureus* e ao *Streptococcus pyogenes* entre todas as bactérias testadas.

MICHELIN et al (2005), pesquisando a atividade antimicrobiana de extratos vegetais utilizou folhas de *Artemisia absinthium* L., *Mentha pulegium* L., *Xanthosema violaceum* Schoott, *Syzygium cuminni* L., e cascas de *Punica granatum* L frente aos microrganismos: *Escherichia. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Cândida albicans* e 11 bactérias resistentes a antibióticos isoladas em ambiente hospitalar : *Staphylococcus aureus* (6), *Escherichia coli* (2), *Proteus* (1) *Pseudomonas aeruginosa* (1) e *Enterobacter sp.* ( 1 ). Nos resultados foi observado que a forma não resistente da *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível aos extratos de *Xanthosema violaceum* (MIC=140ug/ml), *Syzygium cuminii* (MIC=160-180ug/ml) e *Punica granatum* (MIC=25ug/ml). A forma resistente da *Pseudomonas aeruginosa* (1) também foi sensível aos mesmos extratos apresentando MICs = 140.ug/ml, 120ug/ml e 40ug/ml, respectivamente. O extrato de *Punica. granatum* foi o mais efetivo frente as *Pseudomonas aeruginosas* testadas, evidenciando MICs os quais variaram de 25 a 40ug/ml. A *Candida albicans* não foi sensível a nenhum dos extratos.

Investigando a atividade antimicrobiana dos constituintes do *Arctium lappa* contra microrganismos comumente encontrados em infecções endodôntica, PEREIRA et al (2005), utilizaram o extrato bruto das folhas de *Arctium lappa*, que foi fracionado por partição líquido-líquido, levando as frações: aquosa, hexânica, acetato de etila e butanólica. Os microrganismos utilizados foram: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana revelaram que o *Enterococcus faecalis* e a *Pseudomonas aeruginosa* foram sensíveis as frações aquosa, hexânica, acetato de etila e butanólica. Os melhores resultados obtidos foram da fração hexânica frente a todos os microrganismos testados, exceto, a *Candida .albicans* que não foi sensível a nenhuma fração do extrato bruto.

SUFFREDINI, et al, em 2006 estudaram a atividade antibacteriana e citotóxica de extratos de plantas do Brasil, utilizaram 20 extratos obtidos de 6 diferentes gêneros de *Clusiaceae* ( *Tovomita aff. Longifolia*, *T. brasiliensis*, *Clusia columnaris*, *Garcinia madruno*, *Haploclathra paniculata* e *Caraipa grandifolia*). Utilizou-se os seguintes microrganismos nesse estudo: *Staphylococcus. aureus*, *Enterococcus. faecalis*, *Pseudomonas. aeruginosa* e *Escherichia. coli*. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada. Os resultados de acordo com os MICs obtidos demonstraram que todos os microorganismos foram sensíveis aos extratos. O *Enterococcus faecalis* mostrou-se

mais sensível (MIC= 70-200ug/ml) do que a *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=140-200ug/ml). O *Enterococcus faecalis* foi mais sensível ao extrato de *To vomita aff. Longifolia* (MIC=70ug/ml) e a *Pseudomonas. aeruginosa* foi mais sensível ao extrato de *Clusia colummaris* (MIC=140ug/ml).

LIMA et al (2006), estudaram a atividade antibiótica de algumas plantas medicinais do Brasil. Nesse estudo, foi utilizado 22 extratos etanólicos de 16 espécies de plantas, dentre esses, o extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart. O teste de avaliação antimicrobiano foi realizado frente a várias cepas de *Staphylococcus. aureus*, *Proteus mirabilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium. fortuitum*, e cepas isoladas de *Micrococcus flavus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus. subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marscescens*, e *Mycobacterium phle.*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. A. Os resultados evidenciaram que nenhum dos extratos mostrou atividade antimicrobiana contra algumas das bactérias e leveduras testadas dentre elas a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Candida albicans*.

TAKAHASHI et al (2006), testou a atividade antibacteriana de oito plantas da família Annonacea do Brasil. Utilizaram 16 extratos, hexânicos (*Xilopia frutescens*, fruto, TM1, *Xilopia. aromática*, madeira, TM2, *Annona crassiflora*, folhas, TM3, *Annona. muricata*, folhas, TM4, *Annona. cherimólia*, folhas, TM5), etanólicos (*Xilopia. frutescens*, frutos TM6, *Xilopia amazônia*, madeira, TM7, *Xilopia. benthamii*, madeira, TM8, *Annona crassiflora*, folhas, TM12, e sementes TM13, *Annona muricata* folhas, TM14, *Annona cherimólia*, folhas, TM15), metanólico (*Xilopia. aromática*, madeira, TM9), benzeno (*Annona embotay*, madeira, TM11) e clorofórmio (*Xilopia amazonia* madeira, TM10). Os microrganismos utilizados foram: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphilococcus aureus*. Os resultados demonstraram que apenas 6 dos 16 extratos testados (TM1, TM6, TM7, TM10, TM11 e TM15) mostraram atividade antimicrobiana contra pelo menos 1 dos microrganismos testados na concentração de 100ug/ml. Todos os extratos foram ativos frente o *Bacillus. subtilis*, 3 extratos (TM6, TM1, TM15), foram ativos frente ao *S. aureus*, porém nenhum dos extratos foram ativos contra a *Escherichia coli*, *Micrococcus.luteus* e *Pseudomonas. aeruginosa*.



WIART (2007), avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos (Hexano, Diclorometano, Metanol e água) das raízes da *Goniothalamus scortechinii* e observou que apresentaram atividade antibacteriana para o *Enterococcus faecalis*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Proteus sp* e *Candida albicans*, não apresentando atividade antimicrobiana para a *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabela 5.** Atividade antimicrobiana de extrato de plantas e produtos naturais.

Nome da Planta ou Produto natural	Nome popular	Parte testada	Extrato	Uso Medicinal	Microrganismo/CIM (ug/mL)	Refências bibliográficas
<i>Annona glabra</i>	Araticum do brejo	Casca do caule		Antimicrobiano e antifúngico	<i>Stafilococcus pyogênico</i> , <i>Pseudomonas Piocineae</i> / 500. <i>Candida albicans</i> / 100.	PADJAMA et al, 1995.
<i>Melissa officinalis</i>	Erva-cidreira	Não citado	Etanólico	Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	NASCIMENTO et al, 2000.
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjeriço	Não citado	Etanólico	Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NACIMENTO et al,2000.
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	Não citado	Etanólico	Antifúngico e antimicrobiano	<i>Candida albicans</i> e <i>Stafilococcus aureus</i> .	NASCIMENTO et al, 2000.
<i>Punica granatum</i>	Romã	Não citado	Etanólico	Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Bacilo subtilis</i>	NASCIMENTO et al 2000.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Não citado	Etanólico	Antifúngico e antimicrobiano	<i>Candida albicans</i> e <i>Bacilo subtilis</i> .	NASCIMENTO et al, 2000
<i>Syzygium jambolanum</i>	Jambolão	Não citado	Etanólico	Antifúngico e antimicrobiano	<i>Candida Albicans</i> , <i>Stafilococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> . .	NASCIMENTO et al 2000.
<i>Thymus vulgaris</i>	Tolmilho	Não citado	Etanólico	Antifúngico e antimicrobiano	<i>Candida albicans</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	NASCIMENTO et 2000.
Própolis	-----	-----	Etanólico	Antimicrobiano Antifúngico	<i>Actinobacilus actinomycetmcomitans</i> e <i>Capnocytophaga gingivalis</i> /1, <i>Prevotella intermèdia</i> , <i>Prevotella melanogenica</i> , <i>Porfiromonas gingivalis</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> /0,25 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Stafilococcus ureus</i> /14, <i>Candida albicans</i> /14	GEBARA et al, 2002
<i>Miconia stenostachya</i>	-----	Partes aéreas	Etanólico	Antifúngico	<i>Candida albicans</i> /0,58-10,7	CELOTTO et al,2003.

Continuação da tabela 5.

<i>Miconia Albicans</i>	Pau de	Partes aéreas	Hexânico	Antifúngico e antimicrobiano	<i>Candida albicans</i> /0,8-19,7 e <i>Stafilococcus aureus</i> /1,53-16,7	CELOTTO et al, 2003.
<i>Miconia rubiginosa</i>	-----	Partes aéreas	Metilênico	Antifúngico e antimicrobiano	<i>Candida albicans</i> /1,15-20,7 e <i>Stafilococcus aureus</i> /1,73-19,0	CELOTTO et al, 2003.
<i>Aloysia Tryphila</i>	Erva noiva	Não citado	Hexânico	Antifúngico	<i>Candida albicans</i> / 0.70	SARTORATTO, et al, 2004..
<i>Menta piperita</i>	Hortelã pimenta	Não citado	Óleo essencial	Antifúngico	<i>Candida albicans</i> /0,74	SARTORATTO et al, 2004.
<i>Annonaceas da floresta amazônica</i>	-----	Não citado	MeOH:CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> :1:1:34 extratos testados	Antimicrobiano	<i>Stafilococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	SUFREDINNI et al, 2004.
<i>Annona Salzmännii</i>	Araticum do rio	Casca do fruto	Etanólico	Antimicrobiano	<i>Stafilococcus aureus</i> /100	LIMA et al, 2005.
<i>Erythrina velutina Willd.</i>	Molungu	Folhas	Hidrometanólico	Antimicrobiano	<i>Bacilo Cereus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIEIRA et al 2005.
<i>Palmae</i>	Bico de guará	Epicarpo e mesocarpo	Etanólico	Antimicrobiano	<i>Stafilococcus aureus</i> 100 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> /100	SILVEIRA et al, 2005
<i>Styphenthus vulgaris</i>	Erva do passarinho	Casca	Hidroalcoólico	Antimicrobiano	<i>Bacilo cereus</i> e <i>Streptococcus piogênico</i>	VIEIRA et al, 2005.
<i>Punica Granatum</i>	Romanzeira	Folha	Hidroalcoólico	Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 25-40	MICHELIN et al, 2005.
<i>Arctium lappa</i>	Baldrana	Folha	Hidroalcoólico	Antimicrobiano	<i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PEREIRA et al, 2005.
<i>Tovomita longifolia off.</i>	Tovomita	Folha	MeOH/CH <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	Antimicrobiano	<i>Enterococcus faecalis</i> /70mL	SUFREDINNI et al 2006.
<i>Clusia columnaris</i>	Abelha piranha	Caule	MeOH/CH <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> /140	SUFREDINNI et al 2006.
<i>Xylopiá Frutescens</i>	Imbira vermelha	Fruto	Extrato Etanólico	Antimicrobiano	<i>Stafilococcus aureus</i> / <i>Bacilo subtilis</i> / 100	TAKAHASHI et al, 2006.
<i>Annona Ambotay</i>	Urucum	Madeira	Extrato Benzênico		<i>Stafilococcus aureus</i> / <i>Bacilo subtilis</i> / 100	
<i>Annona Cherimólia</i>	Cherimólia	Folha	Extrato Etanólico		<i>Stafilococcus aureus</i> / <i>Bacilo subtilis</i> / 100	

## 2.8 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS E PRODUTOS NATURAIS NAS INFECÇÕES BUCAIS

MARTINEZ et al (1988), compararam os efeitos do propolan (50% de própolis, propilenoglicol em álcool 95%) e álcool 95% (solução placebo) em gengivites crônicas e em úlceras bucais recorrentes e inespecíficas. As conclusões revelaram que os efeitos de propolan sobre os germes gram-positivos da placa supragengival levaram a uma recuperação mais rápida e melhor dos tecidos gengivais nas arcadas experimentais que nas do controle. Os efeitos antimicrobianos, cicatrizantes, anestésicos e de incremento da resposta imune local de propolan, como sugerem os autores, pareceram favorecer uma regressão mais rápida dos sintomas dolorosos, assim como um melhor efeito curativo das úlceras bucais do lado experimental comparados com o lado controle.

MAGRO-FILHO & PERRI em (1990), realizaram estudos com 45 ratos para examinar histologicamente os efeitos da própolis em feridas cirúrgicas pós extrações dentárias (alvéolo) e feridas de pele (uso local). Para este experimento, utilizaram solução hidroalcoólica a 10% de própolis e solução hidroalcoólica pura, aplicados no alvéolo imediatamente após a extração e sobre a ferida, diariamente, até o período de sacrifício dos animais. Concluíram que a aplicação da solução hidroalcoólica de própolis acelerou a epitelização de feridas de pele mas não acelerou a cicatrização após extração dentária.

Estudando a atividade antimicrobiana do flavonóide sophoraflavonona G, isolado de raízes de *Sophora exigua*, contra bactérias oportunistas periodontopáticas, SATO et al (1996), demonstraram que a sophoraflavanona G inibiu completamente o crescimento de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium* e *Eubacterium* de <0.8-25.0 µg/mL. *Staphylococcus* and *Streptococcus* Gram positivos também foram inibidos de 1.56-3.13 g/mL. sophoraflavanona G pode ser um potente composto para a prevenção de infecções orais.

OTA (1998), estudou a atividade antibacteriana, antifúngica e a possível atividade anticariogênica da própolis. A atividade antibacteriana e antifúngica in vitro foi estudada utilizando-se sessenta cepas de leveduras do gênero *Candida*, 25 cepas de *Streptococcus mutans*, 12 cepas de *Staphylococcus aureus*, seis cepas de *Staphylococcus epidermidis* e vinte cepas de *Lactobacillus sp.* Os estudos in vitro demonstraram que a própolis possui atividade fúngica e antibacteriana evidentes. As

leveduras apresentam a seguinte ordem decrescente de sensibilidade: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*. As bactérias apresentaram a seguinte ordem decrescente de sensibilidade: *S. mutans* > *Lactobacillus sp* > *S. aureus* > *S. epidermidis*. A atividade anticariogênica foi estudada in vivo em ratos. Foram utilizados vinte ratos que foram divididos em dois grupos. Um dos grupos recebeu dieta cariogênica e água, enquanto que o outro grupo recebeu dieta cariogênica e água contendo própolis a 1mg/ml. A própolis foi eficaz, retardando o processo de cáries.

BANDEIRA et al (1999), estudaram a atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *Copaiba multijuga* (Óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio e ao óxido de zinco (Pastas), visando sua introdução na Odontologia, tendo em vista as propriedades medicinais deste óleo. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo Método de Difusão e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bacteriana Mínima à frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus mutans*. As pastas experimentais apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*; o óleo essencial apresentou melhor atividade antibacteriana do que a resina quando avaliado isoladamente; o óleo bruto foi bacteriostático e bactericida frente ao *Streptococcus mutans*.

MANARA et al (1999), em uma revisão literária afirmam que na Odontologia a própolis foi utilizada em experimentos em algumas áreas a saber: Endodontia, Cariologia, Cirurgia Oral, Periodontia e Patologia oral. Em todos os trabalhos realizados, mostrou-se evidente a atuação positiva da Própolis para reorganização tecidual em nível superficial e ação antiinflamatória, assim como ação antibacteriana.

BRETZ et al (1999), investigaram as propriedades da própolis em exposições pulpares em ratos, em comparação ao hidróxido de cálcio. O autor verificou que em relação à resposta pulpar, não houve nenhuma diferença significativa entre a aplicação da própolis e hidróxido de cálcio. Ambos os materiais utilizados para capeamento pulpar (própolis e hidróxido de cálcio) foram comparados com relação à reorganização e vascularização normal da polpa, onde a própolis demonstrou melhor resposta em todas as categorias comparadas após 7 dias, exceto para deposição de dentina reparadora. Após 14 dias, o hidróxido de cálcio mostrou-se ligeiramente superior à própolis em manter uma baixa resposta inflamatória e estabilizar a população bacteriana, porém comparando a própolis e hidróxido de cálcio com respeito a formação de pontes e reorganização de tecido mole, a própolis foi superior. Os resultados sugerem, que outras

investigações sobre aplicação da própolis no tratamento e controle de infecções endodônticas devem ser efetuadas.

Pesquisando a atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais em alveolites MELO-JUNIOR et al (2000), afirmam que com o desenvolvimento da fitoterapia, a população carente e os usuários de tratamentos alternativos, podem contar com uma nova fonte de medicamentos, a qual promove menor agressão ao organismo. Nesse trabalho o objetivo foi testar a atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais após terem sido induzidas alveolites em 10 (dez) ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). Depois de coletado o material infectado, foram identificadas 8 (oito) bactérias as quais foram submetidas a testes antimicrobianos. Dentre as substâncias testadas a aroeira (*Schinus terebinthifolius*), e a lafoensia (*Lafoensia pacari*) apresentaram os maiores halos de inibição.

FARIA et al (2006), avaliaram a atividade antimicrobiana in vitro de extratos brutos (n-hexano, diclorometano e etanol) de *Tibouchina stenoscarpa* (*Melastomataceae*) frente a microrganismos da cavidade bucal. Utilizou-se os microrganismos, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacilos casei*, por meio do método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. Os resultados obtidos da CIM demonstraram que o extrato de diclorometano foi o que apresentou maior efetividade contra o conjunto de microrganismos *Streptococcus mitis*, até 250 µg/mL para o *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacilos casei*. O *Enterococcus faecalis* testados, apresentando uma CIM que variou de 150 µg/mL para o foi o mais resistente, apresentando uma CIM >400 µg/mL para todas as frações testadas do extrato.

Investigando a atividade de agentes antibacterianos endodônticos contra bactéria anaeróbias selecionadas, FERREIRA et al (2002), utilizaram 4 agentes antibacterianos: solução aquosa de hidróxido de cálcio a 10%, digluconato e clorexidina a 2%, detergente de mamona a 10% e paramonoclofenol canforado (PMCC) . Os microrganismos utilizados foram: *Prevotella nigrescen*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*. Utilizou-se a técnica de diluição em caldo (RCM e Brucella suplementado) e determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida. Os resultados demonstraram que todos os agentes antimicrobianos apresentaram atividade antimicrobiana, variando para as diferentes

espécies bacterianas, não havendo diferenças entre os caldos utilizados. O digluconato de clorexidina demonstrou a melhor eficiência, com os menores CIMs, seguido pelo detergente de mamona, PMCC e hidróxido de cálcio. *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis* foram às espécies mais resistentes aos agentes.

GEBARA et al (2002), avaliaram a atividade do extrato de própolis contra bactérias nas doenças periodontais. Nesse estudo utilizou-se o extrato etanólico de própolis e as seguintes espécies bacterianas: *Prevotella intermedia*, *Prevotella melanogenica*, *Porphyromonas gengivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacterium gingivallis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Depois de obtidas todas as colônias em meio de cultura apropriado, obteve-se a concentração inibitória mínima (CIM). As bactérias mais sensíveis foram; *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gengivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella melanogenica* as quais apresentaram o CIM de 0.25ug/ml. As mais resistentes foram, *Candida albicans*, (CIM=12ug/ml) e *E.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (CIM=14ug/ml), no entanto todas as bactérias foram inibidas pela ação antimicrobiana do extrato de própolis.

Objetivando comparar in vitro, a ação antimicrobiana dos extratos de Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), Salvia (*Salvia officinalis*) e própolis sobre a microbiota da placa dentária supragengival e saliva não estimulada de 25 indivíduos com periodontite crônica, FIGUEIREDO et al (2004), utilizaram como controle positivo Clorexidina a 0,12 por cento e, como controle negativo, água destilada. Em placas de icgar TSA avaliou-se a ação antimicrobiana de cada substância pura e em diluições seriadas (1 :2, 1 :4, 1 :8). As maiores médias de tamanho de halos de inibição foram obtidas com a Clorexidina, seguida da própolis, Cravo-da-Índia e Salvia. A Própolis apresentou correlação com a clorexidina tanto na inibição de amostras de placa dentária como da saliva. Além disso, também demonstrou propriedades antimicrobianas significativas e exibiu maior ação antimicrobiana sobre a microbiota da placa dentária supragengival quando comparada à microbiota da saliva.

DRUMOND et al (2004), avaliando a atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos comerciais frente aos microrganismos cariogênicos: *S. mutans* (ATCC 2575); *S. sobrinus* (ATCC 27607); *S. sanguis* (ATCC 10557) e *L. casei* (ATCC 4646). Os produtos utilizados foram: Água Rabelo® - (A); Malvatricin® - (B); Mel Rosado® - (C); Apis Flora® - (D); Fitogargarejo® - (E) e Óleo de Copahyba® - (F). Empregou-se

a técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM); Os produtos fitoterápicos foram empregados em concentrações de 100% à 0,19% e os halos de inibição mensurados. Verificou-se para a linhagem *S. mutans* as CIMs de 0,19%; 12,5%; 1,56%; 3,12% e 0,78% para os produtos B, C, D, E e F respectivamente. Para a linhagem *S. sanguis* as CIMs observadas foram de 0,39%; 25%; 1,56%; 6,25% e 0,78% em B, C, D, E e F respectivamente. Sobre o *S. sobrinus* apenas o produto B mostrou atividade antibacteriana na concentração de 0,19%. Em relação ao *L. casei* os produtos B, D, E e F apresentaram respectivamente CIMs de 0,19%; 0,78%; 0,78% e 6,25%. O produto B apresentou os maiores halos frente a todas as linhagens. Concluiu-se que os produtos tiveram desempenhos variados, tendo o Malvatricin® obtido a melhor CIM frente a todas as linhagens, bem como os maiores espectros de inibição e Água Rabelo® não apresentou atividade antibacteriana.

Avaliando os efeitos dos extratos de *Ziziphus joazeiro* (joazeiro), *Cocos nucifera* (coco cravo), *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira), *Aristolochia birottris* (milhomen) e a *Croton cajucara* (sacaca), sobre a microbiota oral de pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo, ALVIANO (2004), demonstrou depois de ter sido determinados concentração mínima inibitória, curva de morte e seus efeitos sobre cepas padrões de fungos e bactérias e de simulações de formação de biofilmes, que o joazeiro apresentou resultados insatisfatórios, principalmente contra os microrganismos organizados em biofilme, já o coco e a catingueira apresentaram algum efeito inibitório, sendo esses usados sob fração aquosa. O milhomen, utilizado sob fração alcoólica, apresentou resultados surpreendentes, chegando a inibir o crescimento dos microrganismos em 1h, no teste da curva de morte. A última planta, a sacaca foi testada sob fração de óleo essencial bruto e seu composto principal (linalol) isolado, tendo o óleo essencial bruto resultados satisfatórios semelhantes à clorexidina, embora o linalol isolado, tenha obtido efeitos satisfatórios apenas contra fungos (*Candida albicans*), o que demonstra com a identificação dos compostos presentes em cada planta, pode-se obter antimicrobianos mais específicos, eficazes e acessíveis.

BARBOSA et al (2004), avaliaram a atividade do extrato aquoso produzido com sementes de guaraná a 5 e 7,5 por cento sobre a placa bacteriana dentária, comparando-o com o gluconato de clorexidina a 0,12 por cento, empregando-se o bochecho como forma aplicativa. A atividade antiplaca foi determinada segundo do método de Greene e Vermillion através do índice de higiene oral simplificado em indivíduos livres de cáries

e doenças periodontais. Os resultados analisados comprovaram estatisticamente a eficiência dos extratos de guaraná em relação ao controle positivo para  $p < 0,05$ .

LIMA et al (2004), avaliaram o potencial de ação antimicrobiano do extrato aquoso do caule da *Schinus terebenthifolius Raddi* (aroeira da praia), frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trycophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Epydermophyton flocosum*. O resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição e demonstrou que dentre as 11 espécies microbianas ensaiadas, 8 (73%) foram sensíveis ao extrato aquoso de *S. terebenthifolius* na concentração de 5000µg/mL. Porém a concentração inibitória mínima (CIM) do produto para algumas cepas foi de 2500µg/mL e, particularmente, a *Candida albicans* foi sensível até 1250µg/mL.

BIANCO (2004), Através de um estudo in vitro, avaliou os efeitos de diferentes extratos vegetais na aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro, a sua atividade antimicrobiana e a influência que esses extratos possuem sobre a capacidade de desmineralização da hidroxiapatita por esses microrganismos. Foram utilizados *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* e 5 isolados clínicos obtidos de pacientes com alto risco à cárie e identificados de acordo com suas características bioquímico-fisiológicas e morfológicas. Extratos vegetais, aquosos e hidroalcoólicos, de casca e folha de angico (*Anadenathera falcata*), casca e folha de araçá (*Psidium cattleianum*), caule de arnica do campo (*Solidago microglossa*), casca e folha de aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*), casca de caju (*Anacardium occidentale*), folha do caju-açu (*Anacardium giganteum*), caule de cancerosa (*Maytenus ilicifolius*), casca e folha de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), casca de capitão do campo (*Terminalia argentea*), casca e folha de cedro (*Cedrela fissilis*), casca e folha da figueira (*Ficus enormis*), folha da folha de carne (*Roupala montana*), folha de guajuvira (*Patagonula americana*), casca e folha de ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*), casca de jacarandá (*Platypodium elegans*), folha de jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*), folha de pau d'Alho (*Gallepsia gorarema*) e folha e casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) foram preparados. De todos os vegetais testados, somente os extratos de folha de araçá, folha da aroeira do sertão, caule da cancerosa, casca da candeia, folha da figueira, folha da guajuvira, casca de jacarandá, folha de jacarandá caroba apresentaram a capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Os extratos de figueira e de jacarandá



caroba não foram capazes de inibir significativamente os microrganismos no biofilme. Observou-se que os extratos que mostraram maior atividade frente às cepas de referência testadas também demonstraram uma maior e mais rápida atividade inibitória frente aos microrganismos em estado planctônico e formando biofilmes.

CUNICO et al (2004), tendo como objetivo investigar a toxicidade *in vivo* do extrato bruto etanólico (EBEtOH) de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, um arbusto característico da Floresta Atlântica e conhecido pelos nativos do litoral paranaense como “anestésia”, devido à sua ação anestésica sobre a mucosa oral. Para tal empregou-se o teste da irritação da mucosa oral. Os resultados mostraram que o EBEtOH desta espécie vegetal não causa irritação, confirmada pelas ausências de edema, ressecamento e escaras na mucosa oral e junção labial dos animais testados.

Estudando o uso de fitoterápicos na saúde bucal, LIMA JUNIOR et al (2005), analisaram 212 questionários respondidos por uma determinada população. O resultado demonstrou que 175 (82,5%) da população utilizava fitoterápicos. No universo de questionários aplicados, obteve-se um número de 829 citações de plantas empregadas para tratar algum agravo à saúde. Dentre essa gama de 829 citações, selecionaram-se as 10 plantas mais prevalentes no estudo, que representaram 55,9% desse universo, malva do reino, hortelã, malva corama, aroeira, camarú, jatobá, mastruz, eucalipto, papaconha e cidreira. No que tange as plantas empregadas na prevenção, tratamento ou cura das afecções bucais, foram selecionadas como mais relevantes a romã, aroeira, cajueiro, malva do reino e malva corama, utilizadas no tratamento de inflamações, odontalgias e processos cicatriciais.

Tendo como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico das partes aéreas de *Aster lanceolatus* Willd. no controle de bactérias presentes na placa dentária, DIAS, et al (2005), verificaram a ação antimicrobiana do extrato bruto etanólico de *Aster lanceolatus* frente a microrganismos da microbiota oral tais como, *Streptococcus mutans* (ATCC 27175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), além de isolados de amostras clínicas de *Pseudomonas sp*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia sp* e *Streptococcus viridans*. Para controle positivo utilizou-se solução de Digluconato de Clorexidina a 0,2%. Os resultados obtidos com o Digluconato de Clorhexidina eram esperados, pois o mesmo é empregado em bochechos com o intuito de reduzir a população de bactérias aeróbias e anaeróbias

presentes na cavidade bucal. O extrato bruto etanólico de *Aster lanceolatus* inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados, incluindo-se as amostras clínicas, com ênfase para a inibição da bactéria *Staphylococcus aureus* superando o resultado obtido com o controle positivo.

Investigando a atividade antimicrobiana dos constituintes do *Arctium lappa* contra microorganismos comumente encontrados em infecções endodônticas, PEREIRA et al (2005), utilizaram o extrato bruto das folhas de *Arctium lappa*, o qual foi fracionado por partição líquido-líquido, obtendo-se 4 fases: aquosa, hexânica, acetato de etila e butanólica. Os microorganismos utilizados foram: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Em virtude da fração hexânica ter demonstrado o maior poder de inibição do crescimento para a maioria dos microorganismos testados, essa fase foi fracionada em coluna de sílica gel eluída com misturas de hexano:acetato de etila numa ordem crescente de polaridade, essa fase foi bioautografada em placas de vidro contendo sílica gel, permitindo obter-se o fator de retenção (Rf). Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana revelaram que o *Enterococcus faecalis* e a *Pseudomonas aeruginosa* foram sensíveis as frações aquosa, hexânica, acetato de etila e butanólica. Os melhores resultados obtidos foram da fração hexânica frente a todos os microorganismos testados, exceto, a *Candida albicans*, a qual não foi sensível a nenhuma fração do extrato bruto. As sub-frações não apresentaram melhores resultados do que a fração hexânica, entretanto a *Candida albicans* apresentou-se sensível quando avaliada por meio de bioautografia mostrando uma variação de Rf (0.11-0.39)

Avaliando a aplicação do extrato de agrião d'água (*Nasturtium officinale*) no controle da placa bacteriana, BUFFON (2005), avaliou *in vitro* a eficácia das diferentes frações obtidas do extrato bruto do *Nasturtium officinale* R. Br frente a solução do digluconato de clorexidina a 0,2% no controle da placa dental. Foram utilizados os microorganismos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Sobre a superfície do meio foram realizadas escavações após o período de incubação, foram observados e medidos os halos de inibição. Foi também testada uma solução para bochecho contendo extrato hidroalcolico a 5% de *Nasturtium officinale* R. Br. em 17 voluntários. Concluiu-se que as diferentes frações obtidas a partir do extrato bruto do agrião mostraram-se eficazes na inibição do crescimento de

diferentes microrganismos presentes na cavidade bucal e mostrou-se eficaz na redução da formação de placa dentária.

BARRETO et al (2005), estudaram o potencial antimicrobiano *in vitro* de 7 dentífricos contendo fitoterápicos (erva doce, melissa, hortelã, juá, malva, própolis, canela, menta, camomila, salvia, mirra e eucalipto), sobre bactérias orais obtidas da saliva e cepas padrões de *S. mutans*, *S. sanguis* e *L. casei*. Levando-se em consideração o controle positivo (dentrifício com triclosan) se constatou que, somente as soluções puras dos dentífricos apresentaram capacidade antimicrobiana contra as cepas padrões equivalente, exceto o Gessy Cristal. Ademais, os dentífricos diluídos a 1:2 apresentaram ação antimicrobiana contra as bactérias orais obtidas da saliva, exceto o Parodontax e Phillips (controle negativo).

SILVA et al (2006), verificando *in vitro*, o efeito antimicrobiano de tinturas fitoterápicas de Sálvia, Tanchagem e Ipê-roxo frente a duas espécies bacterianas causadoras de doença periodontal. As tinturas e as soluções de clorexidina a 0,12% como grupo controle positivo, e álcool de cereais, utilizado no preparo das tinturas, como controle negativo, foram diluídas em solução salina de 1:2 até 1:128. Foram utilizadas cepas de *Porphyromonas gingivales* e *Prevotella melanogenica*. Os resultados demonstraram que a Tanchagem e a Sálvia possuem ação antibacteriana sobre as duas cepas em teste, assim como a clorexidina. Porém a tintura de Ipê-roxo não interferiu no crescimento de *P. gingivales*, sendo *P. melanogenica* única sensível a esta tintura. As cepas apresentaram-se resistentes ao álcool de cereais. Conclui-se que as tinturas de tanchagem e sálvia apresentam maior espectro de atuação antibacteriana, quando comparadas à tintura de Ipê-roxo, sendo seu efeito não influenciado pelo álcool utilizado na sua fabricação.

HAMZA et al (2006), analisaram 65 extratos metanólicos de 56 espécies de 38 famílias de algumas plantas da Tanzânia (*Aloe lateritia* Engl., *Lannea stuhlmanii* Engl., *Sclerocariya birrea* Sond., *Annona senegalensis* Purs., *Strophanthus eminii*, *Gonatopus boivinii* Hook. F., *Balanites aegyptiaca* (L.), *Kigelia africana* L., *Cordia africana* Lam, *Commiphora pteleifolia* Engl., *Lobelia giberroa* Neumeleg, *Cassia abbreviata* Oliv., *Cassia singuena* Del, *Drymaria cordata*, *Elaeodendron buchananii*, *Elaeodendron schlechteranum*, *Tagetes minuta* L., *Coronopus didymus* (L.), *Cucumis aculeatus* Cogn., *Senecio deltoidea* Less , *Zehneria scabra* (L.F.), *Pteridium, linum* (L.), *Diospyros*

*usambarensis* F., *Agauria salicifolia* Oliv., *Acalypha fruticosa* Forsk., *Croton scheffleri* Pax, *Euphorbia ucali* L., *Euphorbia heterophylla* L., *Jatropha multifida* L., *Spirostachys africana* Sonder, *Hypericum roeperanum* A.ich., *Ocimum asilicum* L., *Ocimum suave* Oliv., *Strychnos potatorum* Gilg., *Turraea holstii* Gurk, *Khaya anthotheca* C., *Albizia anthelmintica*, *Acacia robusta*, *Acacia nilotica* (L.) *Ficus sur.*, *Rapanea melanophloeus*, *Indigofera rhynchocarpa* Bak., *Erythrina abyssinica* Lam., *Securi daca longipedunculata*, *Plymbago zeylannica* L, *Ziziphus pubercens* Oliv., *Clausena anisata* Oliv., *Zanthoxylum chalybeum* L., *Hymenidictyon parvifolium*, *Salvadora persica* L, *Sterculia africana*, *Hysophyllum angweolense*, *Solanum incanum* L., *Rhoicissus tridentata*, *Cissus petiolata* Hook. *Cyphostemma hildebrandtii* (Gilg)), utilizadas tradicionalmente no tratamento da candidíase oral. A atividade das plantas foram testadas frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Depois da realização do ensaio de atividade antifúngica por meio do método de microdiluição em caldo e da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), os resultados demonstraram que dos 65 extratos de plantas testados, 26 (40%) inibiram completamente o crescimento de 01 ou mais de 01 fungo testado. Desses 26 extratos, 21 (80%), mostraram atividade contra o *Criptococcus neoformans*, e (65%), 16 (61,5%), 11 (42%) e 5 (19%), demonstraram atividade *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, e *Candida glabrata*, respectivamente. A *Candida albicans* foi sensível somente para 4 (15%) dos 26 extratos de plantas ativos testados.

Analisando a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Anacardium occidentale* L., sobre o *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*, isoladas de biofilme dental, MELO et al (2006), obtiveram a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de poços, por difusão em agar em placas Petri, e a concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) da bactéria ao vidro da placa Petri na presença de Sacarose. Os resultados demonstraram que a concentração inibitória mínima (CIM) (inibição aureolar) foi observada em concentrações de 12,5 mg/mL para o *Streptococcus mutans* e 6,12 mg/mL para o *Streptococcus mitis* e o *Streptococcus sanguis*. A concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) foi de 0,31 mg/mL para os *Streptococcus mutans* e *mitis* a 0,15 mg/mL para o *Streptococcus sanguis*. Os resultados sugerem que o extrato tem efeito

antimicrobiano e terapeuticamente podem ser usados em odontologia como agente antibacteriano.

Observando a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico da folha de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras da cavidade oral, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stelatoidea* e *Candida krusei*, ALVES et al (2006), realizaram uma análise comparativa com o gluconato de Clorexidina à 0,12%. Os ensaios antifúngicos foram realizados pelas técnicas de difusão em meio sólido para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM revelou o resultado de 1:32 para a *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e 1:2 para a *Candida stelatoidea* e *Candida krusei*, formando em média, halos de inibição entre 11 e 22 mm. Diante dos resultados concluí-se que o extrato da folha da *Psidium guajava* (goiabeira) apresenta a capacidade de inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral, o que sugere a utilização deste extrato como meio alternativo no tratamento das candidoses orais.

CORDEIRO et al (2006), avaliaram a atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados numa formulação obtida de gel dentrífico . Foram incorporados aos outros componentes dessa formulação, mistura de extratos hidroalcoólicos secos e pulverizados das plantas *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Plantago major* (tanchagem), *Tabebuia impetiginosa* (ipê-roxo), *Achillea millefolium* (mil-folhas) e *Nasturtium officinale* (agrião). Realizou-se também, a avaliação farmacognóstica preliminar das drogas vegetais pulverizadas e dos extratos secos para a identificação de alcalóides, saponinas, antraquinonas e taninos. Os microrganismos utilizados foram o *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A concentração inibitória mínima foi determinada. Os resultados mostraram que todas as bactérias estudadas foram inibidas pelos extratos utilizados, observando-se que as espécies *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* apresentaram maior sensibilidade. A CIM variou de 312 µg/mL a 1250 µg/mL para os extratos vegetais e para o gel dentrífico foi de 25 mg/mL. Conclui-se que a formulação do gel dentrífico ressaltou prováveis ações antiinflamatórias (flavonóides) e /ou antibacteriana (Taninos), porém estudos complementares são necessários para confirmar a eficácia deste produto e sua utilização na prevenção e tratamento das doenças periodontais.

Pesquisando a atividade antifúngica frente a espécies de *Candidas* orais THAMBURAN et al (2006), compararam a atividade anti-candidal de *Tulbaghia alliacea*, *Tulbaghia violácea* e *Allium sativum* extraídos por clorofórmio e água. As concentrações IC50 de *Tulbaghia alliacea* foi de 0.007-0.038% (w/v). Ensaio utilizando *S. cerevisiae* revelaram que o extrato de *T. alliacea* foi fungicida, com uma meia-vida de aproximadamente 2 h. Este efeito inibitório do extrato da *T. alliacea* foi observado via TLC, e pode ser devido a um composto ativo chamado de *Marasmicinn*. Esta investigação confirmaram que os extratos de *T. alliacea* exibiram atividade anti-infectiva contraespécies de *Candida* *in vitro*. Estudando a ligação e neutralização do Lipopolissacarídeo (LPS), o maior componente da membrana externa das células bacterianas Gram-negativas, causador de graves enfermidades humanas, por Proantocianidinas (PACs) de plantas, DELEHANTY et al (2007), avaliaram PACs (flavonóide e epicatequina) em suco de arandos, chá e uvas e demonstraram que arandos têm a mais potente atividade ligante ao LPS que é contida por meio de uma fração PAC composta de polímeros com uma média de grau de polimerização de 21. A fração PAC inibiu modestamente a ligação de LPS para células HEK 293 expressando total complemento de receptores TLR4/MD2 e CD14, portanto, repelindo significativamente a endocitose de LPS. A fração PAC também inibe a ligação LPS-fator kB de ativação nuclear induzido de uma maneira que não é facilmente repelido pelo excesso de LPS. Tal efeito é mediado pela inibição da interação do LPS com o receptor TLR4/MD2 e pelo parcial repelimento do LPS da interação com o receptor CD14. Nesse estudo, concentrações de PAC que mediarão efetivamente a neutralização do LPS obtiveram mínima citotoxicidade *in vitro*.

CAVALCANTE et al (2007), Avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart., frente a microrganismos da microflora endodôntica. A metodologia utilizada envolveu a preparação do extrato etanólico, e purificação acompanhado pelo bioensaio da atividade antimicrobiana. Também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) das frações ativas do extrato da madeira e da casca da raiz da *Annona crassiflora* comparando com a concentração inibitória mínima (CIM) das drogas padrões (Fluconazol, Ofloxacina, Metronidazol) e o Hidróxido de Cálcio utilizadas neste estudo. Os testes de avaliação antimicrobiana demonstraram que as frações do extrato etanólico da casca da raiz e madeira da raiz da *A. crassiflora* Mart. não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana frente ao

CAPITULO-3

PROPOSIÇÃO

### **3- PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi de avaliar a ação antimicrobiana do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart., frente a microrganismos aeróbios e anaeróbios, Gram-positivos e Gram-negativos da microflora endodôntica, comparando com as drogas padrões utilizadas na terapêutica endodôntica, isolando e identificando os compostos químicos responsáveis pela atividade biológica.



CAPITULO-4

MATERIAL

E

MÉTODOS

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 - ETAPA QUÍMICA I**

#### **4.1.1 - ESCOLHA DA PLANTA**

A planta escolhida para este trabalho foi a *Annona crassiflora* Mart., devido sua ação antimicrobiana verificada em testes realizados pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana do laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Foi demonstrando que o extrato da *Annona crassiflora* Mart. além de ação larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*, ação moluscicida, possui atividade antimicrobiana e de inibição da bomba de efluxo em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (LIMA et al, 2005, LIMA et al, 2006, LIMA et al, 2006). A coleta e a identificação da planta foi realizada em maio de 2003 no estado de Goiás pelo professor Dr. José Elias de Paula da Universidade de Brasília (UnB). Uma exsicata encontram-se depositada no herbário da UnB sob o número JEP 3369 (UB).

#### **4.1.2 – OBTENÇÃO DOS SOLVENTES**

Os solventes utilizados neste trabalho (Metanol, Etanol, Acetato de Etila, Clorofórmio e n-Hexano), foram destilados no laboratório do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas a partir de solventes de grau comercial da marca Herzog, adquiridos da Moraes de Castro (Recife – Pe). Os solventes de grau PA e espectroscópico foram adquiridos da Merck, Aldrich, Carlo-Erba, Grupo Química e VETEC e usados sem tratamento prévio, a não ser quando indicado.

#### **4.1.3 - SELEÇÃO DOS EXTRATOS**

Para a seleção foram utilizadas cinco frações provenientes do extrato da madeira da raiz e seis frações oriundas da casca da raiz de *Annona crassiflora* Mart., selecionadas do trabalho de tese de LIMA (2003). As frações provenientes da seleção dos extratos foram comparadas entre si por cromatografia em camada delgada de sílica (0,25mm de espessura) e diferentes misturas de solventes. Para as frações da madeira da raiz: Hexano, Hexano:Clorofórmio, Clorofórmio, Clorofórmio Acetato de Etila, Acetato

de Etila, Acetato de Etila:Metanol e Metanol. Para as frações da casca da raiz: Hexano, Hexano:Acetato, Acetato e Acetato:Metanol.

#### **4.1.4 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA PLANTA**

A raiz da *Annona crassiflora* (1,20 kg) coletada foi separada em casca e madeira, seca ao ar livre e reduzida a pó, em uma máquina forrageira (mesh 2 mm de diâmetro). O pó da casca e da madeira foram extraídos separadamente com etanol (95%) a temperatura de  $(26 \pm 1^{\circ} \text{C})$  por 03 dias. O processo foi repetido por mais duas vezes. O solvente foi removido em aparelho rotatório, a baixa pressão e os extratos secos obtidos foram armazenados em frascos fechados em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram obtidos 67 g do extrato da madeira da raiz e 603 g da casca da raiz.

#### **4.1.5 – PREPARAÇÃO DOS REVELADORES**

Para a visualização das placas cromatográficas foram utilizados como reveladores solução ácida de Sulfato Cérico  $[\text{Ce}(\text{SO}_4)]$  (1) e solução de ácido fosfomolibídico  $(\text{H}_3[\text{P}(\text{MO}_3\text{O}10)_4]_4)$  em etanol (2). A solução 1 foi obtida pela dissolução de 0,7 g de Sulfato Cérico em 20 ml de água destilada e depois adicionados a esta suspensão 7,0 ml de ácido sulfúrico concentrado  $(\text{H}_2\text{SO}_4)$ , em seguida completou-se o volume com água destilada para 100 ml de solução. A solução 2 foi obtida pela dissolução de 2,5 g de ácido fosfomolibídico  $(\text{H}_3[\text{P}(\text{MO}_3\text{O}10)_4]_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$  em 20,0 ml de etanol  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})$  completando-se o volume com etanol para 100,0 ml de solução. Ambas as soluções são utilizadas na revelação de compostos orgânicos em geral.

#### **4.1.6 - REVELAÇÃO DAS PLACAS**

As placas cromatográficas foram visualizadas por irradiação com luz na região do ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 336 nm, por imersão em cuba de iodo e por borrifação com a solução ácida de sulfato cérico ou solução etanólica de ácido fosfomolibídico, seguindo-se aquecimento a  $80^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

#### **4.1.7 – MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

##### **4.1.7.1 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA**

A comparação dos extratos foi obtida por meio de cromatografia em placas de camada delgada de sílica (CCD), utilizando-se gel de sílica  $\text{GF}_{254}$  da Merck. Depois de obtida a suspensão de 10.0 g de sílica em 22.0 ml de água destilada, esta, foi espalhada

nas placas de vidro (10x3 cm) distribuídas num recipiente apropriado por meio de um espalhador, mecânico com 0,5 mm de abertura. Em seguida, realizou-se a ativação das placas em estufa a 100<sup>0</sup>C por uma hora.

#### **4.1.7.2 – CROMATOGRAFIA EM COLUNA**

#### **4.1.7.3 – COLUNA CROMATOGRÁFICA EM GEL SÍLICA**

Foram utilizadas colunas de diversos tamanhos e diâmetros para a execução das separações cromatográficas. Utilizou-se como suporte o gel de sílica G 60 (70 – 230 mesh) da Merck numa quantidade de 20 a 30 vezes a quantidade em massa da amostra a ser cromatografada.

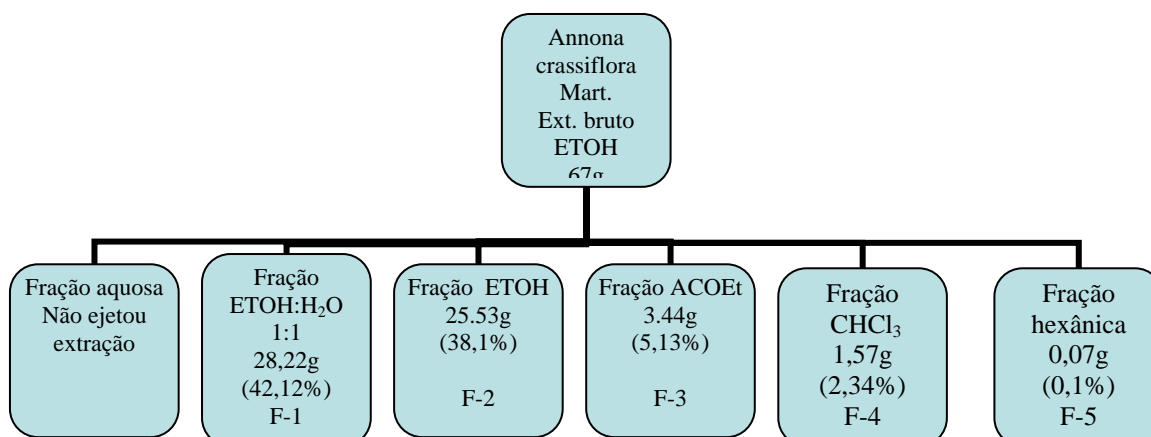
#### **4.1.7.4 - COLUNA CROMATOGRÁFICA EM GEL SEPHADEX LH 20**

A coluna de vidro utilizada continha o suporte empacotado de gel Sephadex LH – 20, (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala - Suécia) e mantido em contato com o solvente a ser utilizado como fase móvel por 24 horas. As amostras foram dissolvidas em quantidades suficientes da fase móvel e então aplicadas suavemente no topo da coluna, tendo o metanol como eluente.

#### **4.1.8.- OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES E SUB-FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DA ANNONA CRASSIFLORA MART. ( MADEIRA DA RAIZ)**

##### **4.1.8.1 - FILTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO (67 G)**

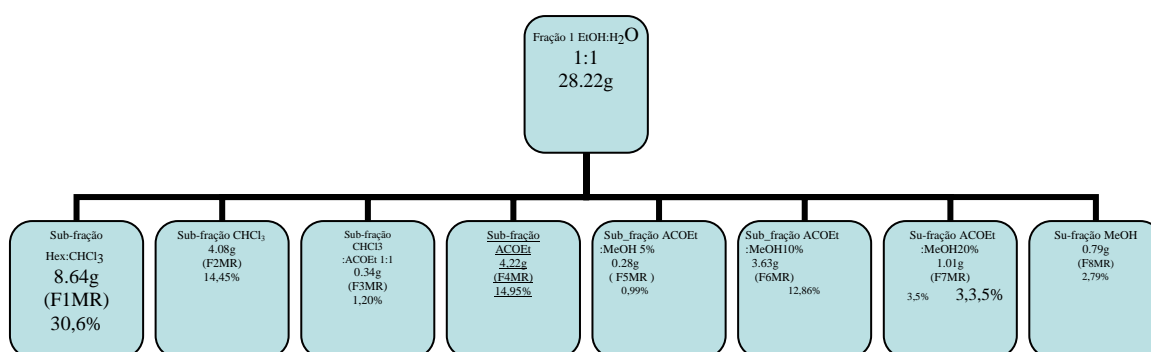
O extrato etanólico bruto (67 g) da madeira da raiz de *Annona crassiflora* foi solubilizado em metanol e incorporado em carvão ativo (154 g). O pó resultante foi transferido para um funil de Buchner que continha gel de sílica (3 cm de altura) e eluído com água:etanol 1:1, acetato de etila, clorofórmio e hexano (1500 mL) de cada eluente. O solvente foi removido em aparelho rotatório a baixa pressão fornecendo as frações respectivas (**Figura 5**).



**Figura 5.** Diagrama da filtração do extrato etanólico bruto da madeira da raiz. As frações obtidas foram comparadas por CCD de sílica, eluídas com o sistema de solvente CHCl<sub>3</sub>:MeOH 5% e reveladas com Sulfato Cérico.

#### 4.1.8.2 – FILTRAÇÃO EM GEL DE SILICA DA FRAÇÃO EM ETANOL:ÁGUA1:1 (F-1) (28,22g)

A fração obtida com etanol:água1:1 (F1) (28,22 g) foi incorporada em gel de sílica e filtrada em gel de sílica (3cm de sílica) por sucção em um funil de Buchner. Como solventes foram utilizados, clorofórmio, acetato de etila, metanol e mistura destes como mostrado na figura 6. Estas frações foram comparadas por CCD. Foram reunidas as frações F3MR e F4MR e selecionadas para estudo de atividade antimicrobiana as frações F1MR, F2MR e F(3+4)MR. (**Figura 6**).

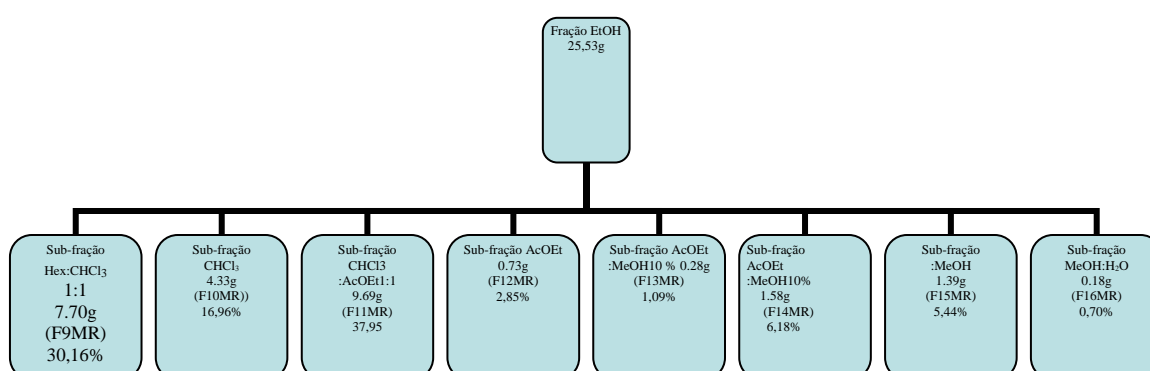


**Figura 6.** Diagrama da filtração da fração EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1)(F1) do extrato bruto da madeira da raiz de *Annona crassiflora* Mart.

\*(FMR)=Fração madeira raiz

#### 4.1.8.3 – FILTRAÇÃO EM GEL DE SÍLICA DA FRAÇÃO EM ETANOL (F2) (25,53 g) DO EXTRATO BRUTO DA MADEIRA DE *ANNONA CRASSIFLORA* MART.

A fração em etanol (25,53 g)(F2) do extrato etanólico bruto da madeira da raiz da *Annona crassiflora* (F1) foi incorporada em gel de sílica e transferido para um funil de Buchner, que continha gel de sílica (3cm de altura) e eluído com clorofórmio, acetato de etila, metanol, água e mistura destes solventes (**Figura 7**).

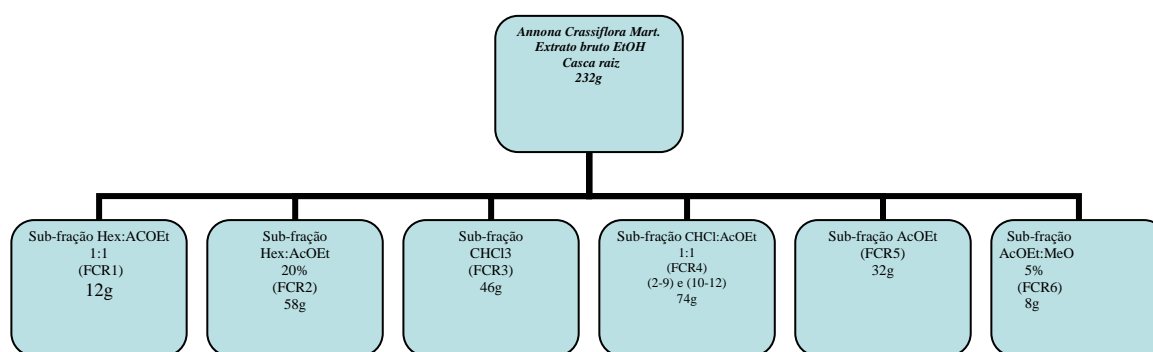


**Figura 7.** Diagrama da filtração da fração em etanol (25,53 g)(F2) do extrato etanólico bruto da madeira da raiz de *Annona crassiflora* Mart. (FMR)=Fração madeira raiz

Análise por CCD destas frações permitiu selecionar para estudo de atividade antimicrobiana as frações F9MR, F10MR, F11MR e F12MR. (**Figura 7**).

#### 4.8.1.4 – FILTRAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (232 g) DA CASCA DA RAIZ.

O extrato etanólico bruto da casca da raiz da *Annona crassiflora* (232g) foi submetido a uma filtração em funil de Buchner com solventes de polaridade crescente, fornecendo seis frações. Após análise por CCD dessas frações, selecionamos a FCR4 para estudo, baseado no comportamento cromatográfico. A fração FCR4 (74g) foi submetida a cromatografia em coluna com gel de sílica (210 g) e eluída com mistura de solvente hexano/metanol (20%, 30% e 50%). Obtivemos as frações FCR4 (2 - 9) e FCR4 (10 - 12). Em seguida selecionamos para estudo da ação antimicrobiana as sub-frações do extrato etanólico da casca da raiz, FCR1, FCR2, FCR3, FCR4(10 a12), FCR4 (2 a 9), FCR5 e FCR6. (**Figura 8**).



**Figura 8.** Diagrama da filtragem do extrato etanólico bruto (232 g) da casca da raiz da *Annona crassiflora* Mart. (FCR)=Fração casca raiz

#### 4.2 - ETAPA MICROBIOLÓGICA I

Os extratos da madeira da raiz (MR) e da casca da raiz (CR) da *Annona crassiflora* e suas frações que continham o material em quantidade suficiente foram selecionadas para teste de atividade antimicrobiana (TABELA 7).

Para comparação com os extratos e frações utilizamos padrões de antibióticos de uso comercial indicados para os microrganismos utilizados no trabalho. (TABELA 8)..

**Tabela 7.** Amostras originadas do extrato bruto etanólico da madeira da raiz (FMR) e da casca da raiz (FCR) da *Annona Crassiflora* Mart. utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

Amostras	PÊSO
1 – Extrato etanólico bruto da madeira da raiz (MR)	9.0 mg (90µg/disco)
2 – Fração EtOH - (FMR)	9.0 mg (90µg/disco)
3 – Sub-fração EtOH (AcOEt) (FMR 11)	9.0 mg (90µg/disco)
4 – Sub-fração EtOH (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1) (FMR 8)	9.0 mg (90µg/disco)
5 – Sub-fração EtOH (CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 1:1) (FMR 10)	9.0 mg (90µg/disco)
6 – Sub-fração EtOH (CHCl <sub>3</sub> ) (FMR 9)	9.0 mg (90µg/disco)
7 – Fração EtOH:H <sub>2</sub> O 1: 1 – (FMR)	9.0 mg (90µg/disco)
8 – Sub-fração EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1) (FMR1)	9.0 mg (90µg/disco)
9 – Sub-fração EtOH:H <sub>2</sub> O1:1 (CHCl <sub>3</sub> ) (FMR2)	9.0 mg (90µg/disco)
10 – Sub-fração EtOH:H <sub>2</sub> O1:1 (CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 1:1) (FMR3)	9.0 mg (90µg/disco)
11 – Sub-fração EtOH:H <sub>2</sub> O1:1 (AcOEt:MeOH 10%) (FMR6)	9.0 mg (90µg/disco)
12 – Sub-fração Hex:AcOEt 20% (FCR2)	9.0 mg (90µg/disco)
13 – Sub-fração Hex: ACOEt 1:1 (FCR1)	9.0 mg (90µg/disco)
14 – Sub-fração (CHCl <sub>3</sub> ) (FCR3)	9.0 mg (90µg/disco)
15 – Sub-fração CHCl:AcOEt1:1 (Hex:MeOH 20%) (FCR4) (2 a 9)	9.0 mg (90µg/disco)
16 – Sub-fração CHCL:AcOEt1:1 (Hex:MeOH 30%) (FCR4) (10 a 12)	9.0 mg (90µg/disco)
17 – Sub-fração AcOET (FCR6)	9.0 mg (90µg/disco)
18 – Sub-fração AcOEt:MeOH 5% (FCR7)	9.0 mg (90µg/disco)

**Tabela 8.** Drogas alopáticas utilizadas como padrões nos testes de atividade antimicrobiana

Drogas	Peso
19 - Ofloxacina (Discos padronizados)	5 ug/disco
19 – Metronidazol (Lab. Sigma chemical company (USA)	9 mg (180µg/disco)
19 – Fluconazol (Lab. Ativus)	75 mg (750 ug/disco)
20 – Ca(OH) <sub>2</sub> (Lab. VETEC Química fina Ltda.)	1.2 mg (24 ug/(disco)

#### 4.2.1 – MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS TESTES

Os microrganismos aeróbios (*Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*), anaeróbio (*Clostridium* sp) e o fungo (*Candida albicans*), foram adquiridos no laboratório de bioquímica e fisiologia de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), enquanto que os microrganismos anaeróbios (*Prevotella melanogenica* e *Bacteroides fragillis*), foram adquiridos junto ao laboratório de microrganismos de referência do departamento de microbiologia do Instituto Nacional de Controle em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz, RJ.(Tabela 9).

**Tabela 9.** Microrganismos utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Cepas
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 27212 (IC55144, IC55068, IC55258, IC55671, IC55995, IC55295, IC55259, IC5354, IC55195, IC55918).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPEDA 39 (IC01, IC02, IC03, IC04, IC06, IC07, IC12, IC17).
<i>Candida albicans</i>	IC01, IC03, IC05, IC07, IC08, IC09, IC10, IC11, IC15.
<i>Clostridium</i> sp	UFPEDA 13
<i>Prevotella melanogenica</i>	ATCC 25845
<i>Bacteroides fragillis</i>	ATCC 43859

#### 4.3 ETAPA MICROBIOLÓGICA II

Nessa fase foi realizado a análise da atividade antimicrobiana das amostras previamente selecionadas (Tabelas 7 e 8). . Esse estudo foi dividido em duas partes. Na primeira, foi investigada a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos aeróbios pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Enterococcus* e *Candida* e na segunda parte avaliamos a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos anaeróbios dos gêneros *Prevotella*, *Bacteroides*, *Clostridium*.



#### **4.3.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DA *ANNONA CRASSIFLORA* MART**

Dos extratos, frações e sub-frações da madeira da raiz (FMR) e casca da raiz (FCR) da *Annona crassiflora* Mart, foram pesadas 9 mg e solubilizadas em 2 mL de etanol afim de se obter uma solução padronizada com uma concentração de 4,5 mg/mL.

#### **4.3.2 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS**

Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram saturados com as soluções padronizadas de cada amostra e em seguida o solvente orgânico (etanol) foi evaporado e obtido discos com uma concentração igual a 90 µg. Discos da amostra de ofloxacina com 5 µg foram utilizados como padrões para *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para *Candida albicans* foram utilizados discos com 75 µg de Fluconazol e para os microrganismos anaeróbios *Prevotella melanogenica*, *Clostridium sp* e *Bacteroides fragilis* foram utilizados discos com 180 µg de metronidazol. Para todos os microrganismos foram utilizados discos com 24 µg de hidróxido de cálcio.

#### **4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AOS MICRORGANISMOS AERÓBIOS.**

##### **4.4.1 MICRORGANISMOS**

Os microrganismos utilizados neste estudo foram as cepas de *Enterococcus faecalis*, ATCC 27212 (IC55144, IC55068, IC55258, IC55671, IC55995, IC55295, IC55259, IC5354, IC55195, IC55918), *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39 (IC01, IC02, IC03, IC04, IC06, IC07, IC12, IC17) e *Candida albicans* IC01, IC03, IC05, IC07, IC08, IC09, IC10, IC11 e IC15. Alguns destes microrganismos mostraram previamente um fenótipo de resistência a diversas drogas antimicrobianas utilizadas em clinica médica (Tabela 4).

##### **4.4.2 CULTURA DOS MICRORGANISMOS**

Os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* foram semeados em Placas de Petri de 90 mm contendo 18 ml de agar Mueller-Hinton enquanto que a *Candida albicans* foi semeada em placas de Petri de 90 mm contendo 18ml de ágar de Sabouraud.

#### 4.4.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

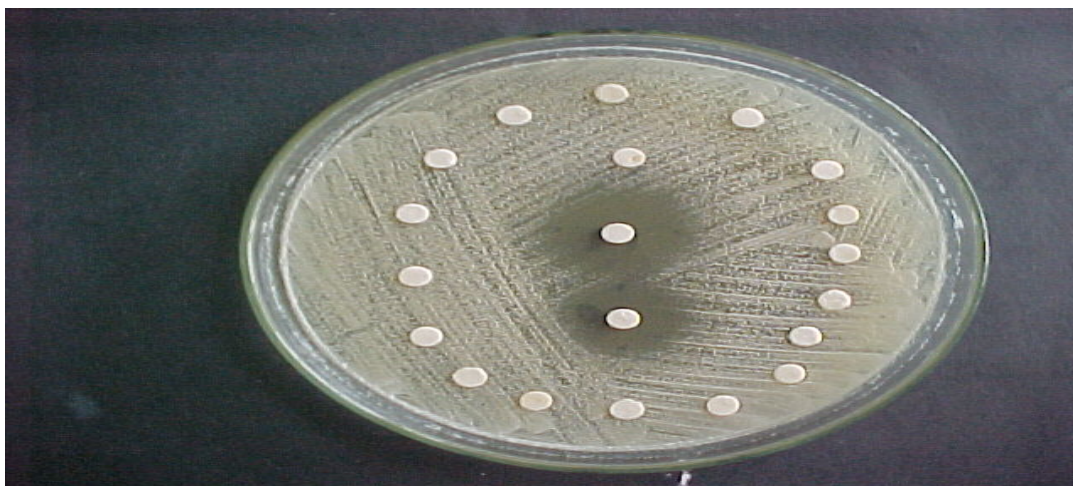
Os microrganismos foram obtidos a partir de pré culturas de 18 horas a 37<sup>0</sup>C em caldo de Mueller-Hinton para *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* ou Sabouraud para *Candida albicans*. O inóculo foi diluído em soro fisiológico de maneira a obter uma opacidade equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland o que corresponde a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

#### 4.4.4 MÉTODO

A atividade antimicrobiana das frações e sub-frações de *Annona crassiflora* Mart. (Madeira e Casca da raiz) frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foi realizada pela metodologia preconizada por BAUER & KIRBY (1966). Os discos foram depositados sobre o meio semeado e incubados a 37<sup>0</sup>C por 18 horas para *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e incubados a 30<sup>0</sup>C por 24 horas para *Candida albicans*.

#### 4.4.5 LEITURA

A leitura foi realizada pela medição do halo de inibição em torno do disco por meio de uma régua milimetrada com escala de 0,1mm. (Figura 9).



**Figura 9** . Fotografia da formação do halo de inibição pelo método de difusão em ágar, pelo método do disco.

## 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AOS MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS

### 4.5.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados neste ensaio foram *Clostridium sp.* UFPEDA 13 *Prevotella melanogenica* ATCC 25845 e *Bacteroides fragilis* ATCC 43859.

### 4.5.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura empregado para crescimento dos microrganismos foi o Tioglicolato de Sódio fluido (BBL) com redutor de Oxigênio + Hemina + Vitamina K.

### 4.5.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

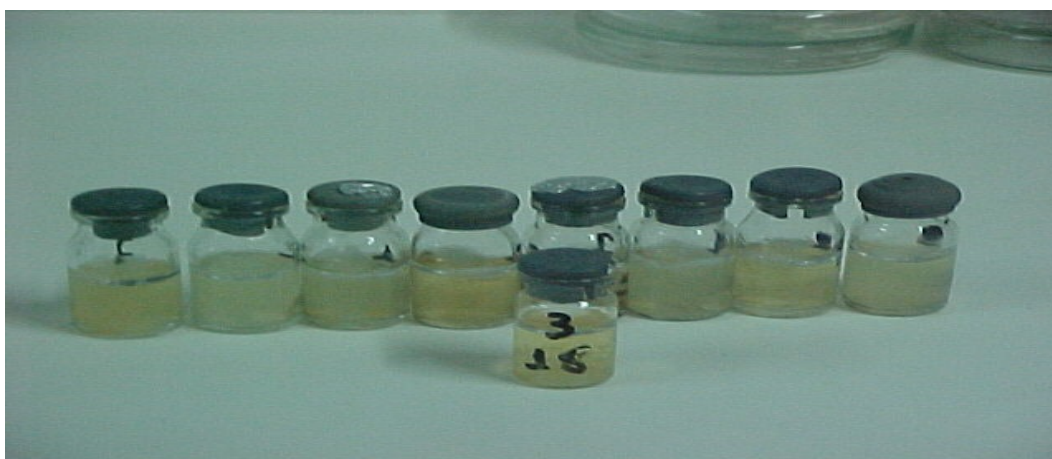
Tubos de ensaio contendo 5mL de caldo com Tioglicolato de Sódio foram inoculados com 0,1mL de microrganismo afim de obter no final uma concentração  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL dos microrganismos anaeróbios e em seguida incubados por 24 horas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 4.5.4 MÉTODO

Para avaliar a atividade dos microrganismos anaeróbios *Prevotella melanogenica*, *Clostridium sp* e *Bacteroides fragilis* foi utilizada a metodologia preconizada por KONEMAM (1997), denominada método de diluição em meio liquido disco de papel de filtro. Utilizou-se para isso 180 discos de papel de filtro de 6 mm. Após serem embebidos em cada droga, 60 discos continham frações e sub-frações de *Annona crassiflora* Mart. ( $90\mu\text{g}/\text{disco}$ ), outros 60 discos continham metronidazol ( $180\mu\text{g}/\text{disco}$ ) e os 60 restantes continham o hidróxido de cálcio ( $24\mu\text{g}/\text{disco}$ ). Depois, três discos contendo  $90\mu\text{g}$  cada das frações e sub-frações de *Annona crassiflora* foram depositados em tubos contendo o caldo Tioglicolato inoculado com os seguintes microrganismos anaeróbios, *Prevotella melanogenica*, *Clostridium sp*, ou *Bacteroides fragilis*. Tubos contendo discos com metronidazol ou hidróxido de cálcio e uma cultura controle também foram incluídos no estudo. Estes tubos foram hermeticamente fechados e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Após o período de incubação foi observado a presença ou não de crescimento bacteriano que foi devidamente registrado. (Figuras 10 e 11)



**Figura10.** Fotografia mostrando ausência de crescimento microbiano anaeróbico.



**Figura 11.** Fotografia mostrando a presença de crescimento microbiano anaeróbico

#### **4.5.5 LEITURA**

A leitura foi realizada pela presença de crescimento visualizada a olho nú através da turbidez do meio.

#### **4.5 - ETAPA QUIMICA II**

#### **4.6 – OBTENÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS**

Após a análise antimicrobiana, as amostras mais ativas dos extratos da *Annona crassiflora* foram selecionadas para o isolamento do princípio ativo e apresentadas na tabela 10, observando-se a quantidade de material.

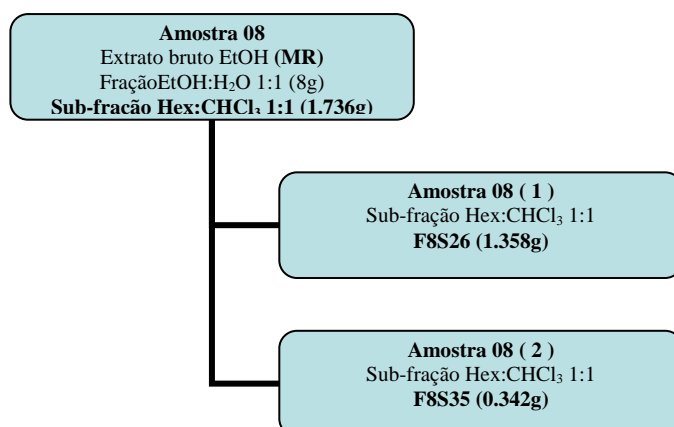
**Tabela 10.** Amostras selecionadas para a obtenção dos princípios ativos após a análise antimicrobiana.

Amostras	Ação antimicrobiana ante:
<b>08</b> – Fração EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (Sub-fração Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1) (MR)	<i>P. Melanogenica</i> , <i>Clostridium sp.</i> , e <i>B. Fragillis</i> .
<b>10</b> – Fração EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (Sub-fração CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 1:1) (MR)	<i>Candida albicans</i> (halo 12), <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> .(halo 09), <i>Prevotella. melanogenica</i> e <i>Bacteroides. Fragillis</i>
<b>12</b> – Fração Hex:AcOEt 20% (CR)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (halo 13), <i>Prevotella melanogenica</i> , <i>Clostridium sp.</i> e <i>Bacteroides fragillis</i> .

#### 4.6.1 – ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS

As amostras selecionadas para esta etapa de trabalho de acordo com a atividade demonstrada anteriormente e a quantidade de material disponível foram as seguintes: FMR8 (madeira da raiz), FMR10 (madeira da raiz) e FMR12 (casca da raiz).

O isolamento dos compostos químicos das frações selecionadas foi realizado através de cromatografia em CCDA, colunas de gel sílica e gel de Sephadex (**Figuras 2, 13 e 14**).



**Figura 12 .** Diagrama mostrando as frações purificadas da amostra 08.

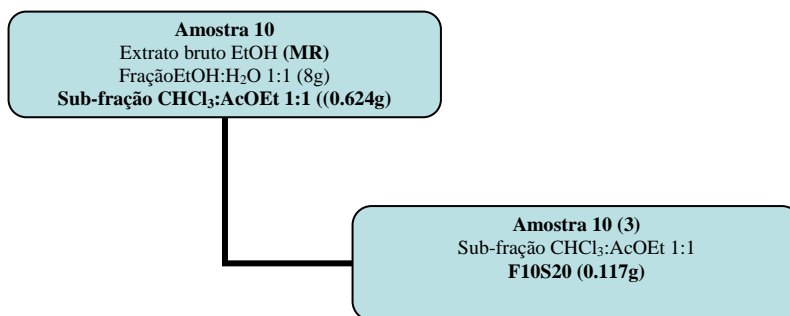


Figura 13 Diagrama mostrando as frações purificadas da amostra 10

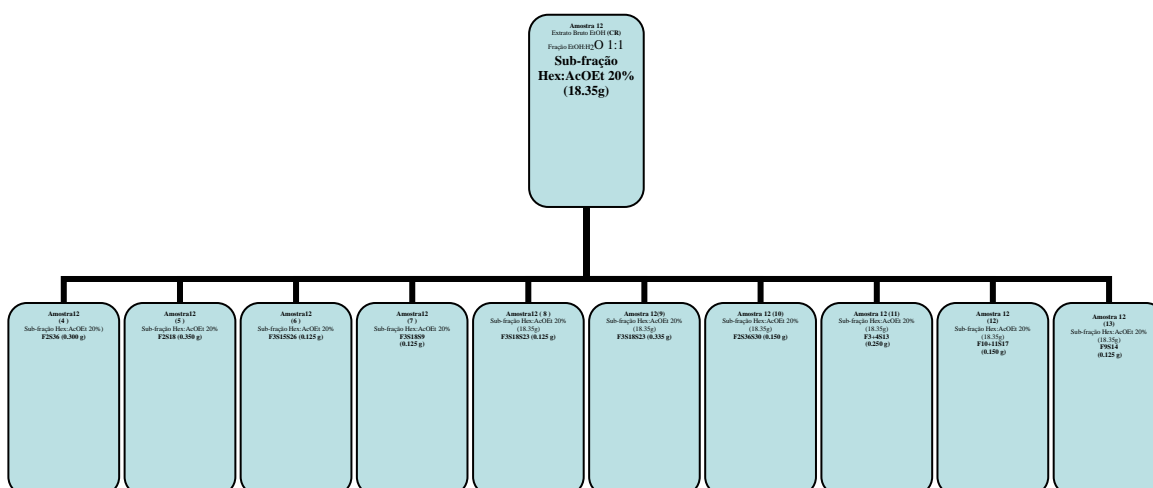


Figura 14 Diagrama mostrando as frações purificadas da amostra 12.

#### 4.7- ETAPA MICROBIOLÓGICA III

Depois do isolamento dos compostos químicos todas as frações purificadas obtidas foram testadas frente à todos os microrganismos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) exceto, o *Enterococcus faecalis*, o qual não apresentou qualquer sensibilidade frente aos extratos estudados anteriormente.

#### 4.7.1 PADRONIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DA CIM

Os extratos da planta, foram pesados e diluídos num sistema composto de DMSO/TWEEN 80/água numa proporção de 1:0,5:8,5 de modo a obter uma solução de concentração igual a 2000µg/mL. O hidróxido de cálcio, o metronidazol e a ofloxacina foram pesados e diluídos em água. Todas as soluções foram filtradas em filtros Millipore com poro de 0,45 e 47 mm de diâmetro.

#### 4.7.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Os microrganismos aeróbios foram obtidos a partir de pré culturas de 18 horas a 37<sup>0</sup>C em caldo de Mueller-Hinton, 48 horas a 37<sup>0</sup>C em caldo de Sabouraud para *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* respectivamente. O inóculo foi diluído em soro fisiológico de maneira a obter uma opacidade equivalente ao tubo 0,5mm da escala de turbidimetria de Mc Fallard em torno de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias(UFC)/mL, visando uniformizar a densidade das soluções.

Os microrganismos anaeróbios (*Prevotella melanogenica*, *Clostridium sp* e *Bacteroides fragilis*) foram semeados em meio de cultura de Tioglicolato de Sódio. A partir desta cultura foi realizada uma enumeração das unidades formadoras de colônia a fim de poder padronizar a cultura em 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL e incubados por 24 horas em estufa a 37<sup>0</sup> C.

#### 4.7.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando o método de diluição em meio líquido preconizado por ANDREWS (2001). Este ensaio foi realizado em 07 placas de microtitulação estéreis de 96 cavidades (INLAB) com fundo em “U”, dentre essas, 06 placas foram utilizadas para 12 drogas e uma placa para outra droga e as drogas padrões. Os inóculos microbianos padronizados em 10<sup>7</sup> foram diluídos 1/10 em solução salina (0,9%) estéril e dessa diluição um volume de 10 µL ( inóculo final 10<sup>4</sup> UF/mL). As drogas padrões utilizadas foram: Ca(OH)<sub>2</sub> (14) para todos os microrganismos (1000µg/mL) , Fluconazol (15) (1000µg/mL) frente a *Candida albicans*, Ofloxacina (15) (1000µg/mL ) frente a *Pseudomonas aeruginosa* e Metronidazol (15) (1000µg/mL) frente aos microrganismos anaeróbios. Também utilizou-se, DMSO, Tween 80 e H<sub>2</sub>O destilada para assegurar uma possível atividade intrínseca deste sistema sobre os microrganismos.

Todas as drogas foram diluídas em 4,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 140 µl de DMSO e 140 µl de Tween 80,. As drogas foram solubilizadas em água em ebulição dentro de uma câmara de fluxo laminar, depois foram esterilizadas por meio de membrana Millipore (0.4mm) e os filtrados colocados em pequenos frascos estéreis. Todos extratos da planta estavam numa concentração de 2000 µg/mL. . Um volume de 200 µL da solução de cada sub-fração do extrato da *Annona crassiflora* Mart. foram colocados nos poços de 1 a 13 da linha A. Também foram preenchidos os poços 14, 15, 16, 17 e 18 da mesma linha, com solução de hidróxido de cálcio, ofloxacina, DMSO(Controle negativo), meio de cultura inoculado (Controle positivo) e meio de cultura (para verificação da esterilidade da preparação) respectivamente. Os demais poços da linha B a H foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller-Hinton, Sabouraud ou caldo de Tioglicolato de Sódio. Em seguida, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para os poços da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para alinha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, obtendo-se assim concentrações decrescentes das amostras ( Linha B-1000 µg/mL; linha C- 500 µg/mL, linha D-250 µg/mL; linha E-125 µg/mL; linha F-62,5 µg/mL; linha G-31,25 µg/mL e linha H-15,63 µg/mL, obtendo-se assim a concentração inibitória mínima de cada droga ante cada microrganismo. Logo após, Um volume de 10 µL dos inóculos microbianos foram adicionados em todos os poços das linhas de A a H.

Logo a seguir, todas as microplacas foram incubadas: *Pseudomonas aeruginosa* a 37<sup>0</sup>C/24hs, *Candida albicans* 30<sup>0</sup>C/48hs em estufa, enquanto a *Prevotella melanogenica*, *Clostridium* e o *Bacteroides fragilis* a 37<sup>0</sup>C/24hs sob atmosfera de anaerobiose. Decorrido esse intervalo de tempo foi acrescido a cada um dos poços 20µL de uma solução aquosa de MTC (Cloreto de Trifenil Tetrazolium, VETEC) a 0,5% e as microplacas foram novamente reincubadas por 24 horas a 35<sup>0</sup>C

#### **4.7.4 LEITURA**

A leitura da CIM foi feita e registrada após a última incubação por visualização a olho nú e a presença de turbidez ou coloração escura na amostra era interpretada como prova negativa do efeito inibitório da droga, enquanto a ausência era considerada prova positiva da ação inibitória da droga sobre os microrganismos.



#### 4.7.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS

Depois da obtenção dos resultados da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras testadas, selecionamos aquelas a serem avaliadas para identificação dos compostos químicos pelo espectrômetro Bruker Avance, operando na frequência de 400MHz no laboratório de RMN do IQB-UFAL. Os dados serão obtidos a partir dos experimentos de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), com a utilização do programa Spin Works. (Tabela 11).

**Tabela 11.** Amostras analisadas pelo método de RMN

<b>Amostra (CIM)</b>	<b>Fração</b>	<b>Peso</b>
A3	F10S20	0.117g
A6	F12F3S15	0,125g
A7	F12F3S18S9	0,125g
A10	F12F2S36S30	0,150g
A11	F12F3+4S13	0,250g
A12	F12F10+11S17	0,150g
A13	F12F9S14	0,125g

# CAPÍTULO-5

## RESULTADOS



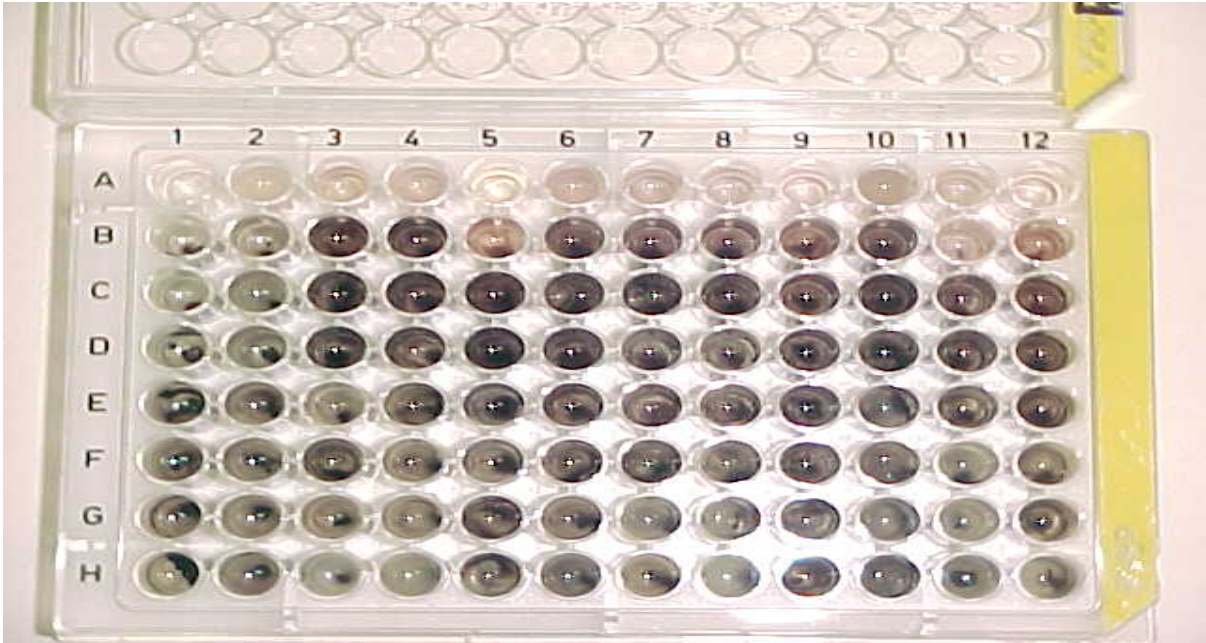
Os resultados obtidos da ação antimicrobiana apresentados na **tabela 13** demonstraram que 3 das cepas estudadas da *Candida albicans* (**01,05 e 10**), apresentaram sensibilidade para 12 (66%) das frações e sub-frações da *Annona crassiflora* Mart. Dessas cepas estudadas, a cepa **05** foi a que demonstrou ser estatisticamente a mais sensível ( $p < 0,05$ ), apresentando halos de inibição que variaram de 9 mm a 12 mm para 9 das frações testadas. No entanto essa cepa (**05**) não foi sensível ao Fluconazol e ao Hidróxido de Cálcio. Já a cepa 01 foi sensível as frações FMR12 e FCR7 enquanto a cepa 10 foi sensível a FMR10. Ambas as cepas não foram sensíveis aos dois controles positivos utilizados.

**Tabela 13.** Resultado da avaliação antimicrobiana frente a *Candida albicans* (IC)  
Valores em mm referente aos halos de inibição.

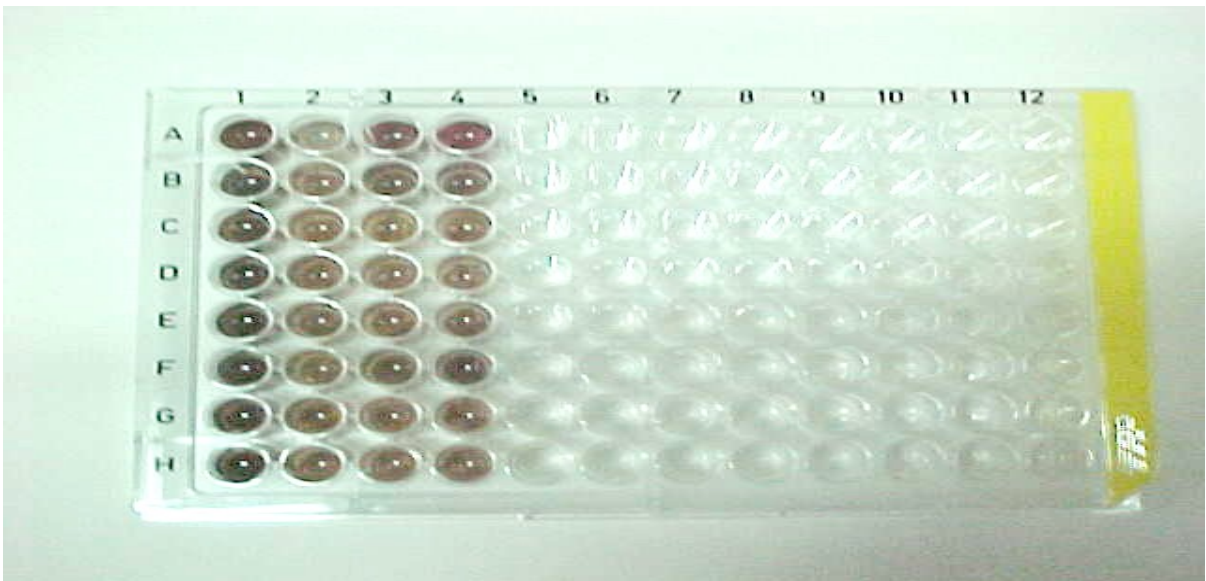
Amostras	Microrganismos ( <i>Candida albicans</i> )									
	01	03	05	07	08	09	10	11	12	15
1 Extrato bruto EtOH			11							
2 Fração EtOH			7							
3 Sub-fração (FMR 12) EtOH(AcOEt)	10		10							
4 Sub-fração (FMR 9) EtOH (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1)										
5 Sub-fração (FMR 11) EtOH(CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 1:1)										
6 Sub-fração (FMR 10) EtOH (CHCl <sub>3</sub> )							9			
7 Fração EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1			11							
8 Sub-fração (FMR 1) EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1)										
9 Sub-fração (FMR 2) EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (CHCl <sub>3</sub> )			9							
10 Sub-fração (FMR 3) EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (CHCl <sub>3</sub> ACOE 1:1)			12							
11 Sub-fração (FMR 4) EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (ACOEt:MeOH 10%)										
12 Fração (FCR 2) Hex:ACOEt 20%										
13 Fração (FCR 1) (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1)										
14 Fração (FCR 3) CHCl <sub>3</sub>										
15 Fração (FCR 4) (CHCl <sub>3</sub> :ACOEt 1:1)(Hex:MeOH 20%)			8							
16 Fração (FCR 4) (CHCl <sub>3</sub> :ACOEt 1:1) (Hex:MeOH 30%)			9							
17 Fração (FCR 6) (ACOEt)			10							
18 Fração (FCR 7) (Hex:ACOEt 1:1) (ACOEt:MeOH 5%)	10									
19 Fluconazol		25				26		15		
20 CaOH <sub>2</sub>		20				12				15

Os resultados apresentados na **tabela 14** demonstraram que todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas (100%) foram sensíveis a alguma fração ou sub-fração do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart, no entanto, não apresentando diferença estatística entre as cepas ( $p > 0,05$ ). As cepas testadas mais sensíveis foram a **04** e **07** que apresentaram sensibilidade a 33% das frações e sub-frações testadas cada, sem no entanto apresentar diferença significativa ( $p > 0,05$ ), seguidas pelas cepas **16** (28%), **03** (22%), **39** (22%), **06** (17%) **12** (17%) e **01** (11%).

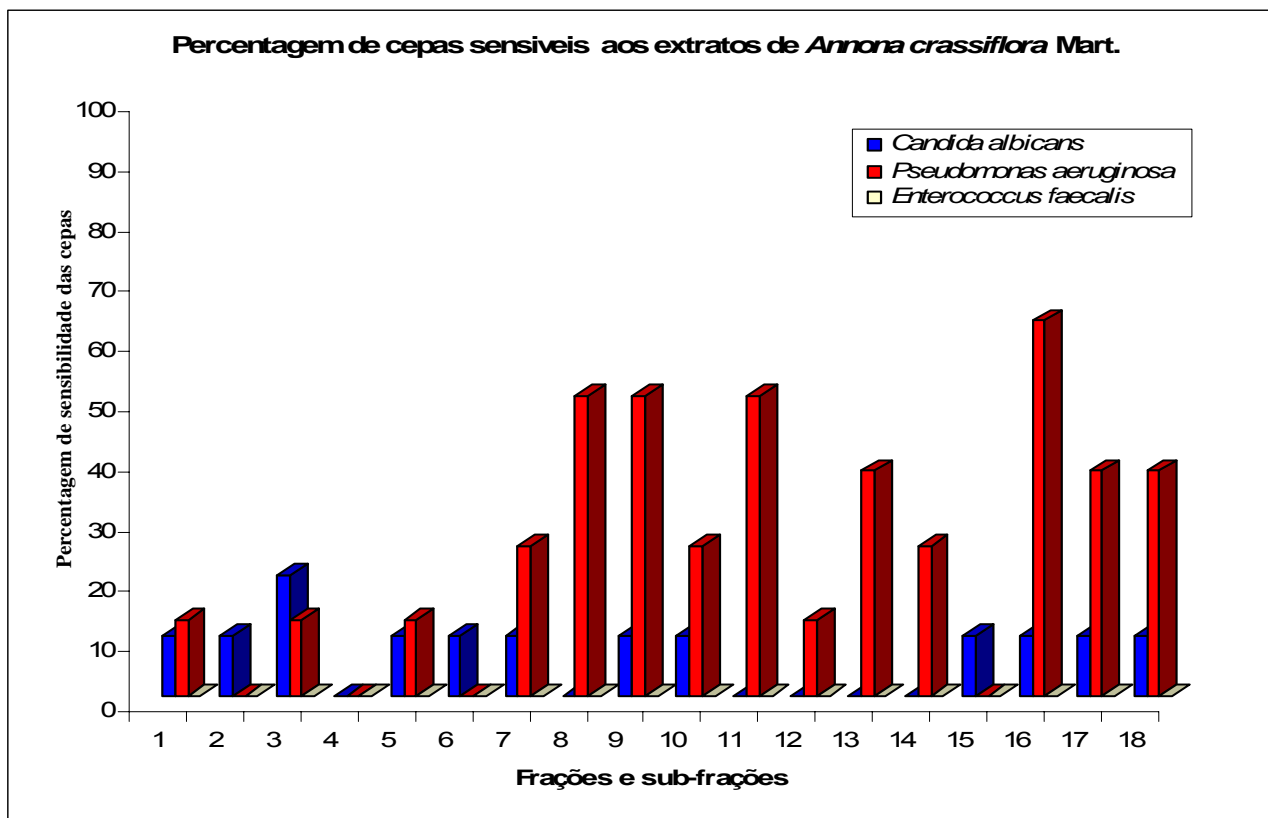




**Figura 15** 1ª Microplaca após a revelação com cloreto de Trifenil Tetrazolium apresenta nos poços de B a H das colunas de 1 a 12 crescimento microbiano. Em A, os poços de 2 a 4, 6 a 8 e 10 a 11 apresentam crescimento bacteriano, enquanto os poços 1, 5, 9 e 12 apresentam ausência de crescimento microbiano.



**Figura 16** 2ª. Microplaca após a revelação com cloreto de trifetil Tetrazolium apresenta nos poços de A a H das colunas de 1 a 4 crescimento microbiano. Na coluna 5, os poços de A a H apresentam ausência de crescimento microbiano.



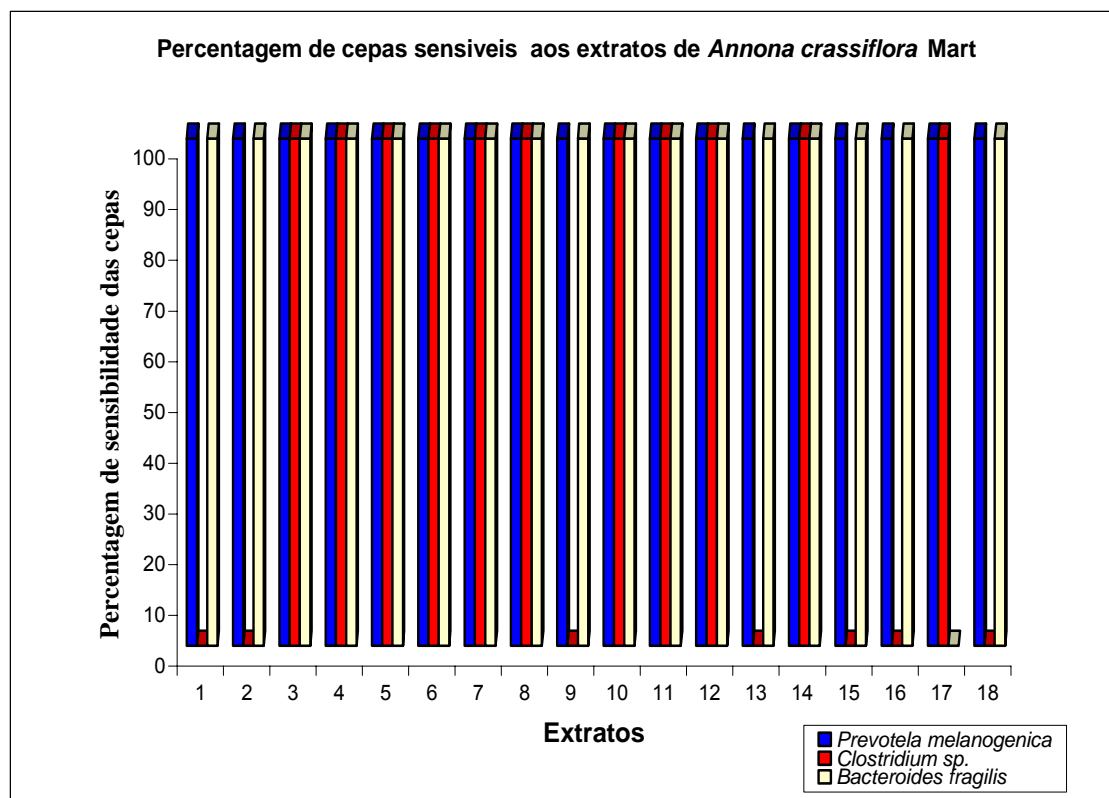
**Figura 17** . Percentagem de cepas sensíveis as frações e sub-frações do extrato de *Annona crassiflora* Mart.

Os dados obtidos da análise antibacteriana do extrato etanólico da *Annona Crassiflora* Mart. e frações numa concentração de 108  $\mu\text{g/ml}$  com os microrganismos anaeróbios mostram uma total efetividade destes frente a *Prevotella melanogenica* (100%) e o *Bacteroides fragilis* (94.44%). Entretanto o *Clostridium sp.* apresentou-se sensível apenas para as amostras 3,4,5,6,7,8,9,11,e 17 testadas (50%), ocorrendo estatisticamente, forte diferença significativa entre as cepas testadas ( $p < 0.05$ ), (Tabela 15) e (Figura 18). A *Prevotella melanogenica* e o *Clostridium sp* central totalmente sensíveis ao metronidazol (108  $\mu\text{g/ml}$ ) e ao hidróxido de cálcio (14,4  $\mu\text{g/ml}$ ), todavia, o *Bacteroides fragilis* não apresentou qualquer sensibilidade frente a essas drogas nas concentrações testadas. As 3 bactérias, *Prevotella melanogenica*, *Clostridium sp* e *Bacteroides fragilis* utilizadas nos grupos controle cresceram em todas as placas (100%), as quais continham o meio de cultura sem nenhuma das drogas utilizadas. (Tabela 15).

**Tabela 15.** Resultado da avaliação antimicrobiana frente aos microrganismos anaeróbios.  
 + = Existiu crescimento bacteriano ( Microrganismo insensível a amostra ).  
 - = Não existiu crescimento bacteriano (Microrganismo sensível a amostra).

<u>Amostras</u>	<u>Microrganismos</u>		
	<i>Prevotella melanogenica</i>	<i>Clostridium sp</i>	<i>Bacteróides fragilis</i>
1 Extrato bruto	-	+	-
2 Fração EtOH	-	+	-
3 Sub-fração (FMR 12) EtOH(AcOEt)	-	-	-
4 Sub-fração (FMR 9) EtOH (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1)	-	-	-
5 Sub-fração (FMR 11) EtOH(CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 1:1)	-	-	-
6 Sub-fração (FMR 10) EtOH (CHCl <sub>3</sub> )	-	-	-
7 Fração EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1	-	-	-
8 Sub-fração (FMR 1)EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1)	-	-	-
9 Sub-fração (FMR 2) EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1 (CHCl <sub>3</sub> )	-	-	-
10 Sub-fração (FMR 3) EtOH:H <sub>2</sub> O 1:1(CHCl <sub>3</sub> ACOE 1:1)	-	+	-
11 Sub-fração (FMR 4) EtOH:H <sub>2</sub> O1:1 (ACOEt:MeOH 10% )	-	-	-
12 Fração (FCR 2) Hex:ACOEt 20%	-	-	-
13 Fração (FCR 1) (Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1)	-	+	-
14 Fração (FCR 3) (Hex:CHCl <sub>3</sub> )	-	+	-
15 Fração (FCR 4) Hex:ACOEt 1:1) (Hex:MeOH 20%)	-	+	-
16 Fração (FCR 5) (Hex:ACOEt 1:1) (Hex:MeOH 30%)	-	+	-
17 Fração (FCR 6) (ACOEt)	-	-	-
18 Fração (FCR 7) (Hex:ACOEt 1:1) (ACOEt:MeOH 5%)	-	+	+
19 Metronidazol	-	-	+
20 Ca(OH) <sub>2</sub>	-	-	+
21 Sem droga (Controle)	+	+	+





**Figura 18.** Percentagem de cepas sensíveis as frações do extrato da *Annona crassiflora* Mart

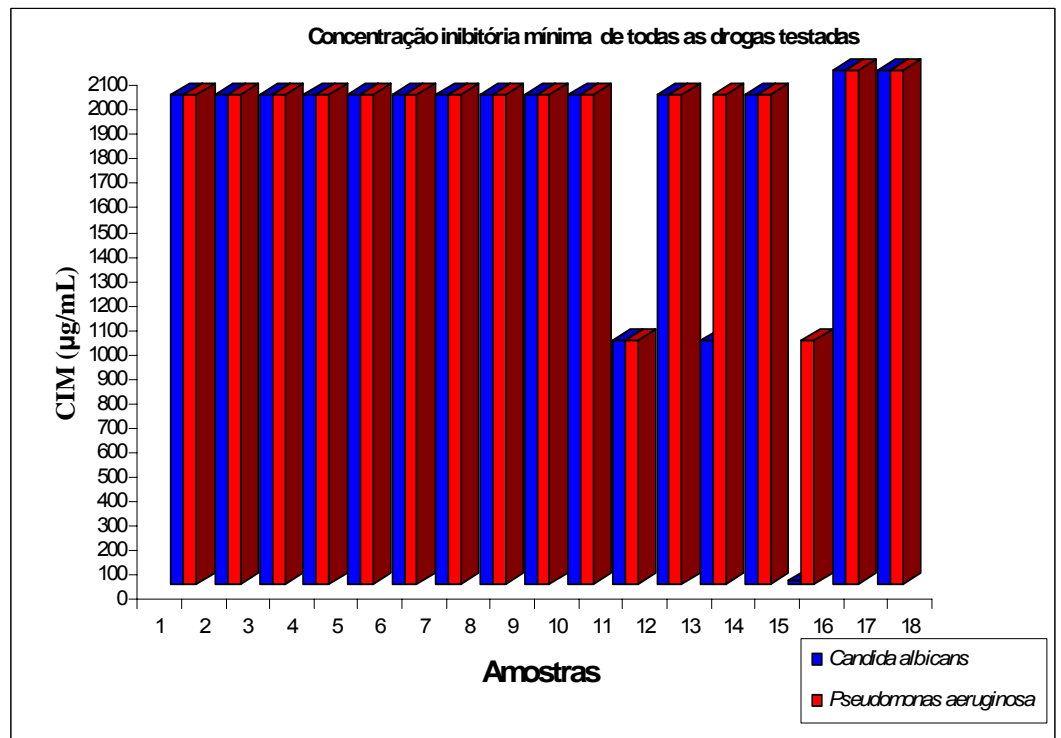
A concentração inibitória mínima (CIM) das frações e sub-frações da *Annona crassiflora* Mart, hidróxido de cálcio e drogas padrões (fluconazol e ofloxacina) frente aos microrganismos testados estão apresentados na **tabela 16 e figuras 19 e 20** demonstram para a *Candida albicans* uma CIM=1000µg/mL a 2000µg/mL, para *Pseudomonas aeruginosa* CIM=1000µg/mL a >2000ug/ml, para a *Prevotella melanogenica* CIM=2000ug/mL, todas muito elevadas, enquanto que para o *Clostridium sp.*, obteve-se um valor de CIM menor (CIM=62µg/ml a > 2000µg/ml), ocorrendo diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade ao hidróxido de cálcio, para o qual a concentração inibitória mínima foi (CIM=2000µg/ml), exceto para a *Prevotella melanogenica* que apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM>2000µg/ml). Com relação as droga padrões, a *Candida albicans* e o *Clostridium sp.* evidenciaram ser bastante sensíveis e a concentração inibitória mínima foi (CIM< 15,8µg/ml e CIM=125µg/ml para fluconazol e metronidazol respectivamente. No entanto para *Pseudomonas aeruginosa*, para *Prevotella melanogenica* e para *Bacteroides fragilis* a concentração inibitória mínima frente as drogas padrões foi CIM=1000µg/ml, ofloxacina CIM>2000µg/ml metronidazol e CIM=1000µg/ml metronidazol. Para todos os microrganismos foram feitos grupos controle

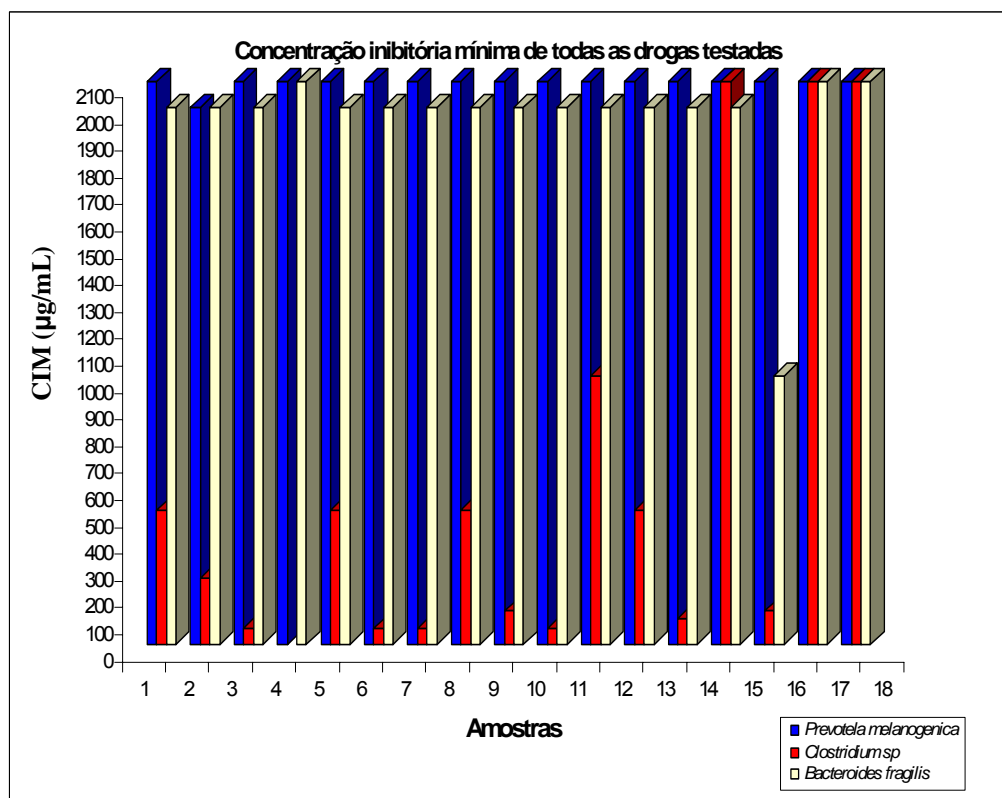
positivo, Microrganismos + DMSO(16) e Microrganismos + meio de cultura (17) e controle negativo, meio não inoculado, DMSO, Tween 80 e água destilada. Os resultados mostraram total crescimento dos microrganismos no grupo controle positivo e ausência de crescimento no grupo controle negativo . (Tabela 16) e (Figuras 19 e 20).

**Tabela 16.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para todos os microrganismos.

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostras</b>	<b>CIM</b>
<i>Cândida albicans</i>	Amostra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12	= 2000µg/ml
	Amostra 11 e 13	= 1000µg/ml
	Amostra 14 (Hidróxido de cálcio)	= 2000µg/ml
	Amostra 15 (Fluconazol)	< 15,8µg/ml
	Amostra 16 e 17 (C.positivo)	>2000µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amostra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12 e 13	= 2000µg/ml
	Amostra 14 (Hidróxido de cálcio)	= 2000µg/ml
	Amostra 15 (Ofloxacina)	= 1000µg/ml
	Amostra 16 e 17 (C. positivo)	> 2000µg/ml
<i>Prevotella melanogenica</i>	Amostra 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13	> 2000µg/ml
	Amostra 2	= 2000µg/ml
	Amostra 14, 15 ,16 e 17	> 2000µg/ml
<i>Clostridium</i>	Amostra 14	> 2000µg/ml
	Amostra 11 e 13	= 1000µg/ml
	Amostra 1, 4, 5, 8 e 12	= 500µg/ml
	Amostra 2	= 250µg/ml
	Amostra 9	= 125µg/ml
	Amostra 15 (Metronidazol)	= 125µg/ml
	Amostra 3, 6, 7 e 10	= 62µg/ml
	Amostra 16 e 17(C. positivo)	> 2000µg/ml
<i>Bacteroides fragillis</i>	Amostra 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, e 14	= 2000µg/ml
	Amostra 4	> 2000µg/ml
	Amostra 15	= 1000µg/ml
	Amostra 16 e 17 (C. positivo)	> 2000µg/ml



**Figura 19** Concentração inibitória mínima das frações da *Annona crassiflora* (1- 13), Hidróxido de Cálcio (14), Ofloxacina e Fluconazol(15), Controle positivo (16 e 17)



**Figura 20.** Concentração inibitória mínima das frações da *Annona crassiflora* (1- 13), Hidróxido de Cálcio (14), Metronidazol (15), Controle positivo (16 e 17).

Os dados oriundos das análises dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 estão apresentados nos anexos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 e a comparação dos dados obtidos por métodos físicos das amostras estudadas (F12S36(A10), F12S15(A6), F12S13(A11), F9S14(A13) e F12S17(A12)) com os dados de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e de métodos físicos obtidos da literatura (Tabelas 17,18,19,20,21,22), permitiu-nos propor a identidade dessas substâncias como sendo a Acetogenina, Goniodonina, podendo ser dependendo de sua estereoquímica, trans (16,19)-Goniodonina, trans-epi(16,19,34)-Goniodonina, cis(16,19)-Goniodonina, cis-epi(16,19,34)-Goniodonina (Alali et al, 1999, Jiang et al, 1997). (Figuras 21 e 22).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das amostras F10S20 (A3), F12F3S18S9 A7 e A12 e comparados com a literatura pertinente sugerem a presença de Acetogenina sem a presença do anel lactônico. (Fang, et al, 1993).(Tabela 22).

**Tabela 17** Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de trans (16,19) Goniodonina.

Posição	10	15	16	19	20	34
$^1\text{H}$ ( $\delta$ )	3,63	3,41	3,78	3,78	3,41	
$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	71,5	74,4	82,5 $^1\text{H}$	82,7	74,3	105,0

**Tabela 18** Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de trans, epi (16,19,34) Goniodonina.

Posição	10	15	16	19	20	34
$^1\text{H}$ ( $\delta$ )	3,63	3,41	3,78	3,78	3,41	---
$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	71,5	74,4	82,5 $^1\text{H}$	82,7	74,3	105,3

**Tabela 19** Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de cis (16,19) Goniodonina.

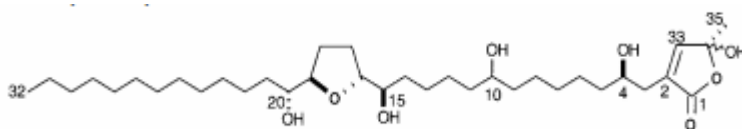
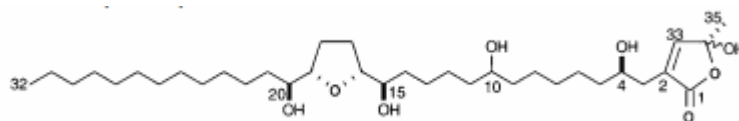
Posição	10	15	16	19	20	34
$^1\text{H}$ ( $\delta$ )	3,63	3,41	3,78	3,78	3,41	---
$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	71,4	74,5	82,6	82,6	74,2	105,0

**Tabela 20** Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de cis, epi (16,19,34)Goniodonina.

Posição	10	15	16	19	20	34
$^1\text{H}$ ( $\delta$ )	3,63	3,41	3,78	3,78	3,41	---
$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	71,4	74,5	82,6 $^1\text{H}$	82,6	74,2	105,3

**Tabela 21.** Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono das Acetogeninas isoladas.

Amostras	A3		A6		A7		A10		A11		A12		A13	
Átomo/ Posição	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
10	3,38	74,3	3,20	71,7	3,39	77,0	3,23	71,7	3,23	79,3	3,40	74,1	3,37	74,5
15	3,54	77,0	3,21	74,3	3,39	76,7	3,23	74,4	3,40	81,7	3,57	74,2	3,39	74,5
16	3,87	77,7	3,79	82,6	3,90	77,3	3,49	82,5	3,84	83,2	3,81	82,5	3,83	83,2
19	3,86	77,7	3,81	82,7	3,91	77,8	3,49	82,7	3,84	83,2	3,79	82,7	3,84	83,2
20	3,38	74,3	3,20	71,7	3,39	77,0	3,23	71,7	3,23	79,3	3,40	74,1	3,37	74,5
34				107,5				107,5		107,5		107,5		107,5

**Figura 21.** Trans(16,19)-Goniodonina. (Trans-epi (16,19,34)-Goniodonina).**Figura 22.** Cis(16,19)-Goniodonina. (Cis-epi(16,19,34)-Goniodonina).**Tabela 22** Dados de RMN de Hidrogênio e Carbono de anéis metil- $\gamma$ -Lactona de acetogeninas.

Átomo/ Posição	A1		A2		A3		A4		A5			
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	Cis <sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	Trans <sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C		
		173,8		174,6		178,2		178,7		173,7		177,4
		134,2		131,1	3,02	43,6	3,03	44,1		133,9....2,56		43,8
3	2,26	25,1	2,51	33,3	1,48	33,36	2,23	33,36	2,40	21,4	a	23,3
			2,38		2,61		1,99					
4 ou 5	1,52	27,4	3,83	69,8	4,39	79,3	4,54	78,9	3,59	70,7	a	27,5
35 ou 33	6,99	148,9	7,17	151,8	2,61	33,36	2,67	33,36	7,05	149,3	4,17	73,8
					3,11		3,05					
36 ou 34	5,00	76,4	5,04	77,9		202,52		205,52	5,01	77,4	4,59	82,5
37 ou 35	1,38	19,2	1,42	19,0	2,20	36,7	2,20	36,7	1,40	19,0	1,38	18,1

a- Não identificado

# CAPÍTULO-6

## DISCUSSÃO

CAPÍTULO-8

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* Linn. bark. **Fitoterapia**. v.72, n.3, p.287-289. 2001
- ALALI, F.Q., LIU, X-X., McLAUGHLIN J.L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **J. Nat. Prod.**, v.62, n.3, p.504-540, 1999.
- ALVES, P.M., LEITE, P.H A.S., PEREIRA, J.V., PEREIRA, L.F., PEREIRA, M.S.V., HIGINO, J.S., LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.192-196, Abr./Jun., 2006.
- ALVIANO, W.S. **Ação antimicrobiana in vitro de extratos de plantas sobre a microbiota oral de pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo**. Dissertação (Mestrado) Rio de Janeiro, 2004, 107p. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 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. Brasil**, v.17, n.4, p.317-322, 2006.
- AMORIM, C.V.G., AUN,C.E., MAYER, M.P.A. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. **Braz. Oral Res.**, v.18, n.3, p.242-246, 2004.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The journal of antimicrobial Chemotherapy*, v.48, n. 1, p.5-16, 2001.
- ÁVILA-CAMPOS, M.J., CARVALHO, M.A.R., MAGALHÃES, P.P., DAMASCENO, C.A.V., SOUZA-CHARTONE, E., CISALPINO, E.O. Antimicrobial resistance and plasmid detection in strains of the *Bacteroides Fragilis* group. **Rev. Inst. Méd. Trop.** v.35,n.1, p.107-110, 1993.
- BANDEIRA, M.F.C.L., OLIVEIRA, M.R.B. DE.; PIZZOLITTO, A.C., BENATTI,N. C. Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio. **J. bras. clin. odontol.integr.**, v.3, n.17, p.46-51, 1999.
- BARBOSA, G., MELO D.A., POLAZZO, J. C. Avaliação clínica do extrato de guaraná no controle da placa bacteriana dentária. **Rev. Pau. Odont.**, v.26, n.4, p.28-30, jul.-ago, 2004.
- BARRETO, L.V., FEITOSA, M.S.C.F.A., ARAÚJO, J.A.T., CHAGAS, K.C.F., LIMA, K. C. Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífricos conteniendo fitoterápicos **Odontoestomatol.**, v.21, n.4, p.195-201, 2005.



BAUER A. W., KIRBY, E.M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BIANCO, K.G. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre *Streptococcus mutans* e a sua capacidade de desmineralização e adesão à superfície de vidro.** Araçatuba, 2004, 94p. Dissertação (mestrado), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista. .

BIRAL, R.R. Bacteriologia dos canais radiculares. Apud HIZATUGU, R., VALDRIGHI, L. **Endodontia, Considerações Biológicas e Aplicações Clínicas.** São Paulo, Ed. Aloisi, 1974, 317p.

BOULOS, M. Treatment by fluconazole of several fungal infections in immunocompromised patients. **Rev.Inst.Med trop.**, v.35, n.1, p.81-87, 1993.

BOAKYE-YIADO, M, K., FIAGBE, N.I., AYIM, J.S. **Lloydia**, v.40, n.6, p.543-545, 1977.

BRETZ, W.A., CHIEGO Jr, D.JM., MARCUCI, M.C., CUNHA, I., CUSTODIO, A., SCHNEIDER, L.G., Preliminary report the effects of propels on wound healing in the dental pulp. **Z. Naturforsch**, v.53, n.11-12, p.1045, 1998.

BOWLER P.G., DUERDEN, B.I., ARMSTRONG, D.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin. Microbiol. Ver.**, n.14, v.4, p.244-269, 2001.

BUFFON, M.C.M. **Aplicação do extrato de agrião d'água (*nasturtium officinale*) no controle da placa bacteriana: uma proposta para a saúde pública.** Paraná, 2005, 119 p. Tese (Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

CARAVACA, H. **Plantas que curam.** Ed.Virtual books, 2000, 66 p.

CAVALCANTE, A.M., SANTOS, L.M., JUNIOR, K.A.L.R., XIMENES, E.C. P.A., SÁNT'ANA, A.E.G. Avaliação da atividade antimicrobiana da *Annona rassiflora* Mart. frente a microrganismos da microflora endodôntica. **Pesq. Bras. Odontoped.** v.7, supl., nov., 2007. Apresentado a IX REUNIÃO DA SOCIEDADE NORDESTINA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, Campina Grande, 2007, **Resumo.**

CARAMORI, S.S., LIMA, C.S., FERNANDES, K.F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. **Braz.arch. biol. technol.**, v.47, n.2, p.253-259, 2002.

CELOTTO, A.C., NAZARIO, D.Z., SPESSOTO, M.A., MARTINS, C.H.G., CUNHA, W.R. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.4, p.339-340, 2003.

CHEIKH, M.C.E., MACHADO, M.I., TAVEIRA, J.J., REIS, C., RODRIGUES, M.V. Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial *Licnophora ericoides* (arnica). **Rev. Patol.Trop.** v.11, n.3, p. 157-160, 1983.

CHEUNG, G.S.P., HO, M.W.M. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. **Oral Microbiol Immunol.** v.16, n.6, p.332-337, 2001.

CHU, D.M., MILLES, H., TONEY, D., NGYUEN, C., MARCIANO-CABRAL, F. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. **Parasitology Research.** v.84, n.9, p.746-752, 1998.

COLMAN- SAIZARBITORIA, T., LIU, X., CRAIG H. D., JOHNSON, H. A., ALALI, F.Q., ROGERS, L.L., MCLAUGHLIN, J.L. Annodienin and jahnonacin: New bioactive nontetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the twigs of *Annona jahnii*. **Natural Product Letters.**, v.14, n.1, p. 65-75, 1999.

CORDEIRO, C.H.G., SACRAMENTO, L.V.S., CORRÊA, M.A., PIZZOLITO, A.C., LARA, E.H.G., MORAES, H.P. Avaliação farmacognóstica antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentrífico. **Rev. Bras. Pl. Méd.**, v.8, n.4, p.173-182, 2006.

CORRÊA M.P., PENNA, L.A. Ministério da agricultura, IBDF. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas.**, 1984. 154 p.

CROCCO, E.I., MIMICA, L.M.J., MURAMATU, L. H., GARCIA, C., SOUZA, V.M., RUIZ, L.R.B., ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An. Bras. Dermatol.**, v.79, nov/dez 2004, Rio de Janeiro.

CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; SBALLI, K.C.2; MIGUEL, O.G. *Ottonia martiana* Miq.: estudo in vivo da irritação da mucosa oral. **Visão Acadêmica**, v.5, n.2, p.147-150, 2004. –

DAHLEN, G., MOLLER, A.R.J. **Microbiology of endodontics infections.**In: Slots J. Tauberman M.A, eds. Contemporary microbiology and immunology. St. Louis: CV Mosby, 1990, 458p.

DELEHANTY, J.B., JOHNSON, B. J., HICKEY, T. E., PONS, T., LIGLER, F. S. Binding and Neutralization of Lipopolysaccharides by Plant Proanthocyanidins. Publisher: American Chemical Society-American Society of Pharmacognosy, **J. Nat. Prod.**, v.70, n.11, p.1718-1724, 2007.

DIAS, J.F.G.; VIRTUOSO, S., DAVET, A.; CUNICO, M.M.; FERRONATO, M.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Avaliação do efeito do extrato etanólico de *aster lanceolatus* willd. (asteraceae) no controle do crescimento das bactérias da placa dentária: estudo “in vitro”. **Visão Acadêmica**, v.6, n.2, jul. - dez./2005.

DRUMOND, M.R.S., CASTRO, R D.A., ROSSANA V.D.P., PEREIRA, M.S.V.; PADILHA, WILTON W.N. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana e produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas **Pesqui. Bras. Odontopediatria clin. integr.**, v.4, n.1, p.33-38, 2004.

ESTRELA, C. SYDNEY, G.B., BAMMANN, L.L., FELLIPE Jr. O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **Rev Fac Odontol Bauru**, v.2, n.4, p.31-38, 1994.

ESTRELA, C., SYDNEY, G.B., BAMMANN, L.L., FELLIPE Jr. O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**, v.6, n.2, p.85-90, 1995.

ESTRELA, C., PIMENTA F.B., ITO, I.Y., BAMMANN, L.L. In vitro determination direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Endodod J.**, v.24, n.1, p.15-17, 1998.

ESTRELA C., FIGUEIREDO, J.A.P. **Endodontia. Princípios Biológicos e Mecânicos**. Artes Medicas. São Paulo. 1999, 819p.

ESTRELA, C.R.A., ESTRELA, C., REIS C., BRAMMANN, L.L., PÉCOR, J.D. Control microorganisms in vitro by endodontics irrigants. **Braz Dent J. Brasil**, v.14, n.3 p.187-192, 2003.

ESTRELA, C. HOLLAND, R. Calcium hydroxide: Study based on scientific evidences. **J Appl Oral Sci.**, v.11, n.4, p.269-282, 2003.

ETSE, J.T., GRAY, A. I., WATERMAN, P.G. Chemistry in the annonaceae, XXIV. Kaurane and Kaur-16-ene ditpenes from the stem bark of *Annona reticulata*. **Journal of Natural Products**, v.50, n. 5, p. 979-983, 1987.

FABRICIUS, L., DAHLEN G., HOLM, S.E., MOLLER, A.J.R. influence of combinations of oral bacteria tisúes of monkeys. **Scand. J Dent Res.**, v.90, n.3, p.200-206, 1982.

FANG, X.P.; RIESER, M.J.; GU, Z.M.; ZHAO, G.X.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: an up date review. **Phytochem. Anal.**, v.4, n.1, p.27-48, 1993.

FARIA, A.U., SILVA, M.L.A.S., MARTINS, C.H.G, CARDOSO, N.A. J F., VINHOLIS A.H C., CUNHA, W.R. atividade antimicrobiana in vitro de extratos brutos de *Tibouchinastenoscarpa* (melastomataceae) frente a microrganismos da cavidade bucal. Apresentado a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE, 29ª, Águas de Lindóia, 2006, **Anais**.

FENNER, R., BETTI, A.H., MENTZ, L.A., RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v.42, n.3, p.369-391, 2006.

FERNANDES, R.P. **Isolamento, Purificação e Caracterização parcial do Lipooligossacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B, cepa N44/89, como componente vacinal**. Rio de Janeiro, 2005, 80p. Dissertação (mestrado), Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Instituto Oswaldo Cruz.

FERNANDES JUNIOR, A., LOPES, M.M.R., COLOMBARI, V., MONTEIRO, A.C.M., VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

FERREIRA, F.B.A. **Estudo in vitro do efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis e de outros medicamentos usados em Endodontia sobre microrganismos anaeróbicos**. Bauru-SP, 1999, 150p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Odontologia Universidade de São Paulo.

FERREIRA, C.M., ROSA, O. P. S., TORRES, S. A., FERREIRA, F. B. A., BERNARDINELLI, N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. **Braz. Dent. J.**, v.13, n.2, p.118-122, 2002.

FERREIRA, D.T., ANDREI, C.C., SARIDAKIS, H.O., FARIA, T.J., VINHATO, E., CARVALHO, K.E., DANIEL, J.F.S., MACHADO, S.L., RARIDAKIS, D.P., BRAZ-FILHO, R. Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian Drosera. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n. 7, p.753-755, 2004.

FIGUEIREDO, L.C.; CORTELLI, S.C.; ARAUJO, M.W.B.; COELHO, M.H.M.; BARRETO, I.M.Q.; FERES, M., Ação antimicrobiana de extratos vegetais sobre a microbiota da placa dentária e saliva: estudo in vitro. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, v.16, n.1, p.15-20, 2004.

FOURNIER, G., HADJIAKHOONDI, A., FOURNIAT, C.B., LEBOEUF, M., CAVE, A. Contribution to the study of various Annonaceae essential oils. **EPPOS.**, v.4, p.704-706, 1993.

FRANK, A.L. Calcium Hydroxide: The ultimate medicament? **Dental Clinics of North America.**, v.23, n.4, p.691-703, 1979.

FURTADO, B T., PIMENTA, L.P S. Estudo fitoquímico das folhas da *Annona crassiflora* Mart. Apresentado a III Semana do conhecimento e XI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, nov/2002. **Resumo**.

FUSS, Z., WEISS, E.I., SHALHAV, M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis* in vitro. **International Endodontic Journal.**, v.30, n.6, p.397-402, 1997.

GALLES, A.C., PIGNATARI, A.C., JONES, R.N., BARETTA, M., SADER, H.S. Avaliação da atividade in vitro dos novos antimicrobianos da classed as fluorquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas, **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.43, n.2, p.137-144, 1997.

GEBARA, E.C.E., LIMA, L.A., MAYER, M.P.A. Própolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v.33, n.4, p.365-369, 2002.

GOMES, B.P.F.A, LILLLEY, J.D, DRUCKER, D.B. Clinical significance of dental root canal microflora. **Journal of dentistry.**, v.24, n.1-2, p.47-55, 1996.

GONÇALVES, M.A., LARA, T.A., PIMENTA, L.P.S. Alcalóides oxaporfínicos da madeira da *Annona crassiflora* Mart. Apresentado a 29ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. **Resumo.**

HAAPASALO, M. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.6,n.2, p.213-218, 1993.

HAMZA, O. J. M., Van den Bout-Van den Beukel, C.J.P, MATEE, M.I.N., MOSHI, M.J., MIKX, F.H.M., SELEMANI, H.O., MBWAMBO, Z.H., Van der Vem, A. J. A. M., VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108, n.1, p.124-132, 2006.

HERMANN, B.W. Calciumhidroxid als Mittel zum Behandeln und Füllen Von Wurzelkanalen. **Wurzburg Med. Diss.**, 1920. Apud ESTRELA C., FIGUEIREDO, J.A.P. **Endodontia, princípios biológicos e mecânicos**. Artes medicas, Brasil, p.82, 1999, 818p.

ARAYA H. Studies on Annonaceas Tetrahydrofuranic Acetogenins from *Annona Squamosa* seeds. **Bull. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci.**, n.23, p.77-149, 2004

HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A.; TOUCHÉ, A.; FORGACS, P. Alcaloides des Annonacées. XXXVI: Alcaloides de L'*Annona crassiflora* Mart. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**. v.16, n.1, p.4-6, 1982.

ITO, C.Y.K., MARTINS, C.A.P., LOBERTO J.C.S., SANTOS, S.S.F., JORGE, A.O. C. In vitro antifungal susceptibility of *Candida ssp*. Isolates from patients with chronic periodontitis and control patients. **Braz. Oral Res.**, v.18, n.1, p.80-84, 2004.

JACINTO, R.C., GOMES, B.P.F.A., FERRAZ, C.C. R., ZAIA, A A., SOUZA-FÍLHO, F.J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic, teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. **Oral Microbiology Immunology**, v.18, n.5, p.285-292, 2003.

JIANG, Z, CHEN Y, CHEN, R-Y, YU, D- Q, Y. Mono-Tetrahydrofuran ring Acetogenins from *Goniothalamus donnaiensis*. **Phytochemistry**, v.46, n.2, p.327-331, 1997.

JOLY, A.B. **Botânica; introdução à taxonomia vegetal**, v.13, São Paulo: Companhia Editora Nacional. 2002. 778p.

JONES. R.N., ERWIN, E.E., ANDERSON, S. C. Fluoroquinolone Resistance Surveillance Group. Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States: 1. Study on threat of emerging resistences: real or perceived? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.19, p.203-215, 1994..

KOTKAR H.M., MENDKI, P.S., SADAN, S.V.G.S., JHA, S.R., UPASANI, S.M., MAHESHWARI, V. L. **Pest Management Science**, v.58, n.1, p.33-37, 2002.

KURZYNSKI, T.A., YRIOS, J.W., HELSTAD, A.G., FIELD, C.R. Aerobically incubated thioglycolate broth disk method for antibiotic susceptibility testing of anaerobes. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.10, n.4, p.727-732, 1976.

LE BOEUF M., 1982, CAVÉ A., BHAUMIK, P.K., MUKHERJEE, B, MUKHERJEE R. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2783-2812, 1982.

LEONARDO, M.R., SILVA, B.A.R., ASSED, S., NELSON-FILHO, P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. **J Appl Oral Sci.**, v.12,n.2, p.93-98, 2004.

LIMA, E.O., PEREIRA, F.O.P., OLIVEIRA, I.L., NOGUEIRA, V.T., SOUZA, E L. Schinus Terebenthifolius Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**. v.16, nº 7-8, p.81-83, 2004.

LIMA-FILHO, J.V.M., CARVALHO, A.F.F.U., FREITAS, S.M., MELO V.M.M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**., v.33, n.4, p.311-313, 2002.

LIMA JUNIOR, J.F., VIEIRA L.B., LEITE, M.J.V., LIMA, K.C. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. **Saúde Rev., Piracicaba**, v.7, n16, p.11-17, 2005.

LIMA, M.D.P. **Acetogenina de *Annona crassiflora* Mart., com forte ação sobre as larvas do *Aedes Aegypti***. Dissertação (Mestrado), Maceió, 2003, 88p, Instituto de Química-Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

LIMA, M.R.F., LUNA, J.S., MENDONÇA, F.A.C., SANT'ANA, A.E.G. Rolicinina uma acetogenina de *Annona crassiflora* Mart. com atividade sobre as larvas do *Aedes aegypti*. Apresentado a 29ª. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. Águas de Lindóia, 2006. **Anais**.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; DOS SANTOS, A.F.; DE ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B. NEUVILLE, L.; MOREAU, N. The Antibacterial Activity of Some Brazilian Medicinal Plants, **J. Ethnopharmacology**, v.105, n.12, p.137-147, 2006.

LIMA, M.R.F., XIMENES, E.C.P., LUNA, J.S., SANT'ANA A.E.G. The antibiotic of some Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**., v.16, n.3, p.300-306, 2006.

LOMOVSKAYA, O.; WARREN, M.S.; GALAZZO, G.; FRONKO, R.; LEE, M.; BLAIS, J.; CHO, D.; CHAMBERLAND, S.; RENAU, R.; HECKER, S.; WATKINS, W.; HOSHINO, K; ISHIDA, H.; ISHIDA, H.; LEE, V.J. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance flux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.45, n.1, p.105-116, 2001.

LOESCHE, W.J., GIORDANO, J., HUJOEL, P., SCHWARCZ, J., SMITH, B.A. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. **J. Clin Periodontol.**, v.19, n.2, p.103-112, 1992.

LOTUFO, R.F.M., PANUTTI, C.M., SARAIVA, M.C. Bacteroides Forsythus: sensibilidade a antimicrobianos em amostras de pacientes portadores de periodontite. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.15, n.1, p.47-50, 2001.

LUNA ,J.S., CARVALHO, J.M., LIMA, M.R.F., BIEBER, L.W., BENTO, E.S., FRANCK, X., SANT'ANA, A.E.G. Acetogenins in *Annona Muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Natural Product Research**, v.20, n.3, p.253-257, 2006.

MAGRO-FILHO, O., PERRI DE CARVALHO, A. C. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **J. Nihon. Univ. Sch. Dent.**, v.32, n.1, p.4-13, 1990.

MANARA, L.R.B., GROMATZKY, A., CONDE, M.C., BRETZ, W.C. Utilização da Própolis em Odontologia. **Rev. FOB.**, v.7, n.3/4, p.15-20, 1999.

MANNICA, I., ICUMA, I.M., JUNKEIRA, K. P., OLIVEIRA, M. A. S., CUNHA, M. M., OLIVEIRA Jr, M.E., JUNQUEIRA, N. T. V., ALVES, R. T. **Frutas anonáceas: Ata ou Pinha, Atmóia, Cherimólia e Graviola. Tecnologia e produção, pós colheita e mercado.** Ed. Correntes. Porto Alegre-RS, 2003, 569p.

MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N. J., GENET, J-P., SANTOS, A.F., ANDRADE, M.C.C., SANT'ANA, A. E. G. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. **Phytochemistry**, v.66, n.15, p.1804-1811, 2005.

MARTINEZ, S.A. Estudio preliminary sobre los efectos del propolan an el tratamiento de la gingivitis cronica y de las ulceras bucales. **Rev. Cubana Estomat.**, v.29, n.3, p.14-19, 1992.

MELO JUNIOR, E.J.M.R., MARIANA, J.; SANT'ANA, A.E.G.; LISBOA ,N.J.A. DINIZ, M. F. A.. Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite. **Rev. ABO. Nac.**, v.8, n.4, p.220-226, 2000.

MELO, A.F.M., SANTOS, E.J.V.S., SOUZA, L.F.C.S., CARVALHO, A.A.T., PEREIRA, M. S.V., HIGINO J. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.1, n.2, p.202-205, 2006.

MENIM, M.F. **Atividade antimicrobiana de fármacos coadjuvantes da instrumentação de canais radiculares.** Pelotas, 1993.Dissertação (Mestrado), faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas. Rio Grande do Sul.

MINAMI, O.S., OLIVEIRA, F. Atividade antifúngica de *Bidens pilosa* L. **Rev Bras Farmacogn.**, v.1, n.2, p.118-122, 1986.

MICHELIN, D.C., MORESCHI, P.E., LIMA, A.C., NASCIMENTO, G.G.F., PAGANELLI, M.O., CHAUD, M.V. avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.316-320, 2005.

MOLLER, A.J.R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. **Odontol. Tidskr.**, v.74, n.5, p.1-38, 1966.

MOLLER, A.J.R., FABRICIUS, L., DAHLEN, G., OHMAN, A E., HEYDEN, G. Influence, on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, v.89, n.6, p.475-484, 1981.

MOLANDER A., REIT, C., DAHLEN, G., KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int End J. Sweden**, v.31, n.1, p.1-7, 1998.

MOREIRA, I C., LAGO, J.H.G., ROQUE, N.F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopi* *emarginata* (Annonaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v.31, n.5, p.503-537, 2003.

MOREIRA, I.C., LAGO, J.H.G., ROQUE, N.F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopi* *brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v.33, n.9, p.948-951, 2005.

NAIR, P.N.R., SJOGREN, U., KAHNBERG, G., SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi root filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J. Endod.**, v.16, n.12, p.580-588, 1990.

NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000.**, v.13, n.12, p.29-39, 1997.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS P.C., SILVA L.G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. Brasil, v.31, n.2, p.247-256, 2000.

NKUNYA M.H.H., JONKER, S.A., MDEE, L.K., WAIBEL, R., ACHENBACH, H. New diprenylated indoles from *Asterantes asterias* (Annonaceae). **Natural Product Letters.**, v.9, n.1, p.71-78, 1996.

OLIVEIRA D C., ROSELI, F L., SAMPAIO, J.E.C., RODRIGUES JUNIOR, A.L. Redução do índice de placa com listerine: avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. **Rev. Gaúcha Odontol. Porto Alegre**, v. 46, n.2, p.101-104, 107-108. 1998.

OTA, C. **Avaliação in vitro, da atividade antimicrobiana e ação anticariogênica da própolis em ratos.** São José dos Campos, 1998, 105p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

PADJAMA, V., THANKAMANY, V., HARA N., FUJIMOTO. A., HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.48, n.1, p.21-24, 1995.

PANZARINI, R.S., SOUZA, V., HOLLAND, R., JÚNIOR DEZAN E. Association of calcium hydroxide and metronidazole in the treatment of dog's teeth with chronic periapical lesion. **J. Appl Oral Sci.**, v.14, n.5, p.334-340, 2006.

PAOLINO, V.J., KASHKETT, S. Inhibition by cocoa extracts of biosynthesis of extracellular polysaccharide by human oral bacteria. **Arch Oral Biol**, v. 30: n.4, p.359-363. 1985.



PAZELLI, L.C., CAMPOS DEFREITAS, A., YTO, I.Y., SOUZA-GUGELMIN, M.C. M., MEDEIROS, A. S., NELSON-FILHO, P. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes decíduos de humanos com necrose pulpar e lesão periapical crônica. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.17, n.4, São Paulo, 2003.

PEREIRA, J.V., BERGAMO, DC.B., PEREIRA, J.O., FRANÇA, S.C., PIETRO, R.C.L.R., SILVA-SOUZA, Y.T.C. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontics infections. **Braz Dent J**, v.16, n.3, p.192-196, 2005.

PETERS, L.B., WESSELINK, P.R., WINKELHOFF, A.J. Combinations of bacterial species in endodôntic infections. **International Endodontic Journal**, v.35, n.8, p.698-702, 2002.

PINHEIRO, E.T., GOMES, B.P.F.A., FERRAZ, C.C.R., SOUZA, 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, n.1, p.1-11, 2003.

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 filed teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal.**, v.37, n.11, p.756-763, 2004.

PROSSER, B.L.T., BESKID, G., Multicenter in vitro comparative study of fluorquinolones against v25129 gram-positive and gram-negative clinical isolates. **Diag Microbial Infect Dis.**, v.21, n.1, p.33-45, 1995.

RANI, A., CHOPRA, A., Isolation and identification of root canal bacteria from syntomatic nonvital teeth with periapical pathosis. **Endodotology J.**, v.18, n.1, p.12-17, 2006.

RIBEIRO, O.M.N., PASQUAL, M. **Tecnologia da produção do marolo**. Univ. Federal de Lavras. Pró-reitoria de extensão. Minas Gerais, ano XI, n.129, 2005. 53p.

RIBEIRO, C.S., KUTEKEN, F.A., JUNIOR HIRATA, R., SCELZAM, F.Z. Comparative evaluation of antimicrobial action of MTA, Calcium Hydroxide and Portland Cement. **J. Appl. Oral Sci.**, v.14, n.5, p.330-333, 2006.

RIETSCHER, E.T., BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Scientific American**, v.267, n.2, p.54-61, 1992.

ROCHA, M.M N.P., MOREIRA, J.L.B., MENEZES, D.B., CUNHA, M.P.S.S., CARVALHO, C.B.M. Estudo bacteriológico de lesões periapicais. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.12, n.3, p.215-223, 1998.

ROESLER, R., MALTA, L.G., CARRASCO, C., PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of food science.**, v.71, n.2, p.102-107, 2006.

ROLPH, H.J., LENNON, A. RIGGIO M.P., SAUNDERS, W.P., MACKENZIE, D., COLDERO, L., BAGG, J. Molecular identification of microorganisms from endodontics infections. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.39, n.9, p.3282-3289, 2001

ROSA, O.P.S., TORRES, S. A., FERREIRA, F. B.A. *In vitro* effect intra-canal medicaments on strict anaerobes by means of the broth dilution method. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 16, n.1, p.31-36, 2002. .

ROWLAND, B. Anaerobic infection: **Information from Answers.com**, 2007.

SADER, H.S., ERWIN M.E., JONES, R.N. In vitro activity of OPC-1716 compared to other broad-spectrum fluorquinolones. **J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.11. n.4, p.372-381, 1992.

SAFAVI, K.E., NICHOLS, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod.**, v.19, n.2, p.76-78, 1993.

SAINI, S., GUPTA, N., LOKVEER A., GRIWAN, M.S. Surgical infections: A microbiological study. **Brazilian Journal Infections Diseases.**, v.8, n.2, p.118-125, 2004.

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

SANTOS, L.P., BOAVENTURA, M.A.D. Crassiflorina uma acetogenina Tetra-Hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v.17, n.5, p.387-391, 1994.

SANTOS, L P., BOAVENTURA, M.A.D., SUN, N-J., OLIVEIRA, A.B., CASSADY, J. M. Grossamide and N-trans-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* seeds. **Planta Méd.**, v.62, p.76. 1996.

SANTOS, L.P., BOAVENTURA, M.A.D., SUN, N-J., CASSADY, J.M., OLIVEIRA, A. B. Araticulin, a Bis-Tetrahydrofuran Polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v.43, n3, p.705-707, 1996.

SANTOS, P.R.D., MORAIS, A.A., BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dióica*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, n.3, p.396-400, 2003.

SARTORATTO, A., MACHADO, A.L.M., DELARMELINA C., FIGUEIRA M.G., DUARTE, M.C.T., REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology. Brasil**, v.35, n.4, p.275-279, 2004.

SATO, M., TSUCHIYA, H., TAKASE, I. Antibacterial activity of plant flavonoid (sophoraflavanone G ) against periodontopathic and opportunistic bacteria. **Shika Yakubutsu Ryoho**, v.15, n.1, p.33-39, 1996.

SCHAFER, E., BOSSMANN, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **Endodontics J.**, v.31, n.1, p.53-56, 2005.

SEN, B.H., PISKIN, B., DEMIRCI, T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endod Dent Traumatol.**, v. 11, n.1, p.6-9, 1995.

SILVA, P. **Farmacología**, Ed. Guanabara Koogan, 5ª ed. P.946, 1314p, 1998.

SILVA, B.N., CLAUDINO, L.V., NEVES, A.S., COSTA, A.C., VALENÇA, A.M.G. Avaliação da atividade antimicrobiana de tinturas fitoterápicas sobre *Phorphyromonas gingivalis* e *Prevotella melanogenica*. **Pesq. Bras. Clin. Integr.**, v.6, n.2, p.167-171, 2006.

SILVEIRA, C.S., PESSANHA, C.M., LOURENÇO, M.C.S, JUNIOR, I.N., MEZEZES F.S., KAPLAN, M.A.C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.15, n.2, p.143-148, 2005.

SIMEON, S., RIOS, J.L., VILLAR, A. Antimicrobial activity of *Annona crassiflora* stem bark alkaloids. **Pharmazie**, v.45, n.6, p.442-443, 1990.

SLOTS, J., TAUBMAN, M.A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. Mosby., 1992, 649p.

SOBRINHO, A.P.R., BARROS, M.H.M., NICOLI, J.R., CARVALHO, M.A.R., FARIAS, L.M., BAMBIRRA, E.A., BAHIA, M.G.A., VIEIRA, E.C. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. **Journal of Endodontics**, v.24, n.6, p.405-408.1998.

.STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**, v.6, n.3, p.89-96, 1990.

SUFFREDINI, I.B., PACIENCIA, M.L.B., NEPOMUCENOD, C., YOUNES R.N., VARELLA, A.D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts Clusiaceae. **Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro**, v.101, n.3, p.287-290, 2006.

SUNDQVIST, P. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Thesis (PHD), n.7, Umea. University of Umea, Sweden, 1976.

SUNDQVIST, G., FIGDOR, D., PERRSON, S., SJOGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg. Oral med. Oral Path.**, v.85, n.1, p.86-92, 1998.

TATAGIBA, F. **Plantas do cerrado**. [www.biologo.com.br/plantas/cerrado](http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado), 2007.

TAKAHASHI, J.A., PEREIRA, C.R., PIMENTA, L.P.S., BOAVENTURA, M.A.D., SILVA, L.G.F. Antibacterial activity of eight Brazilian *Annonaceae* plants. **Natural Product Research**, v.20, n. 1, p.21-26, 2006.

THAMBURAM, S., KLAASEN, J., MABUSELA, W.T., CANNON, J.F., FOLK, W., JOHNSON, Q. *Tulbaghia alliacea* phytotherapy: a potential anti-infective remedy for candidiasis. **Phytotherapy Research**, v.20, n.10, p.844-850, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4ª ed. Atheneu., São Paulo, 2005, 717p.

TRUONG, P., PHAM, M.T., TRAN, T.L. Study on the antibacterial effects of leaves of *Annona glabra* L. Annonaceae. **Tap Chi Duoc Hoc**, v.10, p.8-10, 1999.

TRONSTAND, L. Recent development in endodontic research. **Scand. J. Den. Res.**, n.100, p.52-55, 1992.

UENO L.S. **O efeito de um verniz com clorexidina e de um verniz com flúor na redução de Streptococcus mutans no índice de placa bacteriana.** Araçatuba. Dissertação (Mestrado), 2001, 110p, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

VAN BAMBEKE, F.; BALZI, E. TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**. v.60, n.4, p.457-470, 2000.

VAN BAMBEKE, F.; GLUPEZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PÉCHÉRE, J.C.; TLKENS, P.M. 94. Antibiotic efflux in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.51, n.5, p.1055-1065, 2003.

VEIGA-JUNIOR, V.F., ANGELO, C.P. Plantas medicinais: Cura segura? **Quim.Nova**, v.28 n.3, p.519-528, 2005.

VERGANI, S.A., SILVA, E.B., VINHOLIS, A.H., MARCANTONIO, R.A.C. Systemic use of metronizadole in the treatment of chronic periodontitis: A pilot study using clinical, microbiological, and enzymatic evaluation. **Braz. Oral Res.**, v.18, n.2, p.121-127, 2004.

VIEIRA, O.M.C., SANTOS, M.H., SILVA, G.A., SIQUEIRA, A.M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva do passarinho). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p.149-154, 2005.

VILLAR, A., MARES, M., RIOS J. L., CANTON, E., GOBERNADO, M. Antimicrobial activity benzyloquinoline alkaloids. **Die Pharmazie**, v.42, n.4, p.248-250, 1987.

VIANNA, M.E., GOMES, B.P.F.A., SENA, N.T., ZAIA, A.A., FERRAZ, C.C.R., SOUZA FILHO, F.J.S. In vitro evaluation of the susceptibility of endodôntica pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. **Braz Dent J.**, v.16, n.3, p.175-180, 2005.

VIRTUOSO, A.S., DAVET, J.F.G., DIAS, M.M., CUNICO, M.D., MIGUEL, A.B., OLIVEIRA, O.G.M. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.137-142, 2005.

XAVIER M N. **A fitoterapia no controle às afecções bucais.** João Pessoa: Idéia, 1995.

YAMASAKI, M., NAKANE, A., KUMAZAWA, M., HASHIOKA K., HORIBA, N., NAKAMURA, H. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. **J Endod**, v.18, n.10, p.501-504, 1992.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Estratégias para Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

WALTIMO, T.M.T., SIRÉN, E.K., TORKKO, H.L.K., OLSEN, I., HAAPASALO, M. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **Int Endod J.**, v.30, n.2, p.96-101, 1997.

WEIGNER, R., MANNCKE, B., WERNER, H., LOST, C. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod. Dent. Traumatol.**, v.11, n.1, p.15-19, 1995.

WESTPHAL, O. Bacterial endotoxins. **Int Archs Allergy Appl Immun.**, v.49, n.1-2, p.1-43, 1975.

WIART C. Goniiothalamus Species: A source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? **eCAM**, v.4, n.3, p.299-311, 2007.

# ANEXOS

## 9 - ANEXOS

### NPar Tests Cochran Test

**Anexo 1.** Avaliação estatística da frequência de sensibilidade as frações do extrato extrato de *Annona crassiflora* Mart, das cepas de *Candida albicans*

#### Frequencies

	Value	
	0	1
CEPA1	16	2
CEPA5	9	9
CEPA10	17	1

#### Test Statistics

N	18
Cochran's Q	10,364 <sup>a</sup>
df	2
Asymp. Sig.	,006

a. 0 is treated as a success.

### NPar Tests Cochran Test

**Anexo 2.** Avaliação estatística da frequência de sensibilidade as frações do extrato de *Annona crassiflora* Mart, das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

#### Frequencies

	Value	
	0	1
CEPA1	16	2
CEPA3	14	4
CEPA4	12	6
CEPA6	15	3
CEPA7	12	6
CEPA12	15	3
CEPA16	13	5
CEPA39	14	4

#### Test Statistics

N	18
Cochran's Q	5,174 <sup>a</sup>
df	7
Asymp. Sig.	,639

a. 0 is treated as a success.

**ANEXO 3.** Avaliação estatística comparativa da média de frequência de sensibilidade das cepas dos microrganismos *Candida albicans* x *Pseudomonas aeruginosa* frente as frações do extrato da *Annona crassiflora* Mart.

		VAR		Total
		Candida	Pseudomona	
SENSÍVEL	0	7		7
	1	3	8	11
Total		10	8	18

Chi-Square Tests					
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9,164(b)	1	,002		
Continuity Correction(a)	6,455	1	,011		
Likelihood Ratio	11,840	1	,001		
Fisher's Exact Test				,004	,004
Linear-by-Linear Association	8,655	1	,003		
N of Valid Cases	18				
a Computed only for a 2x2 table					
b 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,11.					

## NPar Tests

### Kruskal-Wallis Test

**Anexo 4.** Avaliação estatística da média de frequência de sensibilidade dos microrganismos anaeróbios frente as frações do extrato da *Annona crassiflora* Mart.

#### Ranks

GRUPO	N	Mean Rank
AMOSTRA Prevotella	18	23,00
Clostridium	18	35,00
Bacteróides	18	24,50
Total	54	

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	AMOSTRA
Chi-Square	14,919
df	2
Asymp. Sig.	,001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO



**ANEXO 5.** Avaliação estatística comparativa da média de frequência de sensibilidade dos microrganismos anaeróbios frente as frações do extrato da *Annona crassiflora* Mart.

## NPar Tests Mann-Whitney Test

**Ranks**

	GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
AMOSTRA	Prevotella	18	18,00	324,00
	Bacteróides	18	19,00	342,00
	Total	36		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	AMOSTRA
Mann-Whitney U	153,000
Wilcoxon W	324,000
Z	-1,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,791 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUPO

## NPar Tests Mann-Whitney Test

**Ranks**

	GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
AMOSTRA	Prevotella	18	14,50	261,00
	Clostridium	18	22,50	405,00
	Total	36		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	AMOSTRA
Mann-Whitney U	90,000
Wilcoxon W	261,000
Z	-3,162
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,022 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUPO

**NPar Tests****Mann-Whitney Test****Ranks**

	GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
AMOSTRA	Clostridium	18	22,00	396,00
	Bacteróides	18	15,00	270,00
	Total	36		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	AMOSTRA
Mann-Whitney U	99,000
Wilcoxon W	270,000
Z	-2,657
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,047 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUPO

**ANEXO 6.** Avaliação estatística do resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações da do extrato

da *Annona crassiflora* Mart., frente a todos os microrganismos testados.

**NPar Tests****Kruskal-Wallis Test****Ranks**

	GRUPO	N	Mean Rank
CIM	Clostridium	13	7,23
	Candida	13	31,35
	Pseudomonas	13	32,92
	Bacteroides	13	36,38
	Prevotella	13	57,12
	Total	65	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	CIM
Chi-Square	55,789
df	4
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

**NPar Tests****Kruskal-Wallis Test**

**ANEXO 7.** Avaliação estatística comparativa da Concentração Inibitória Mínima de todos os microrganismos testados frente as frações do extrato da *Annona crassiflora* Mart.

**Ranks**

	GRUPO	N	Mean Rank
CIM	Clostridium	13	7,23
	Candida	13	25,85
	Pseudomonas	13	26,92
	Total	39	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	CIM
Chi-Square	31,030
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

**NPar Tests****Kruskal-Wallis Test****Ranks**

	GRUPO	N	Mean Rank
CIM	Candida	13	18,08
	Pseudomonas	13	19,54
	Bacteroides	13	22,38
	Total	39	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	CIM
Chi-Square	3,466
df	2
Asymp. Sig.	,177

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

## NPar Tests

### Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank
CIM	Candida	13	18,50
	Pseudomonas	13	20,00
	Bacteroides	13	23,38
	Prevotella	13	44,12
	Total	52	

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	CIM
Chi-Square	36,971
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

## NPar Tests

### Mann-Whitney Test

#### Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CIM	Clostridium	13	7,00	91,00
	Prevotella	13	20,00	260,00
	Total	26		

#### Test Statistics<sup>b</sup>

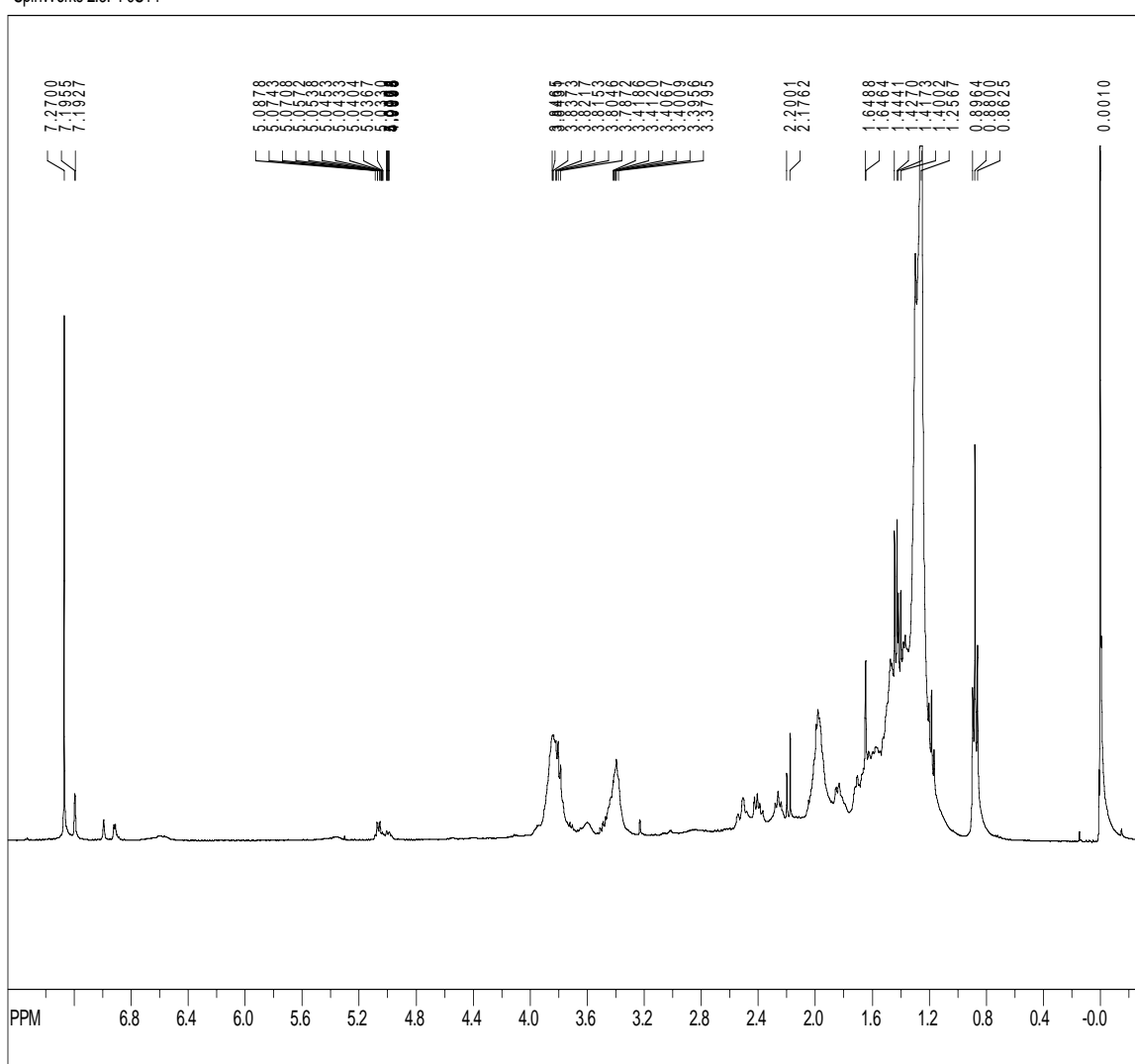
	CIM
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	91,000
Z	-4,589
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUPO

### Anexo 8. Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A13) F12F9S14.

SpinWorks 2.3: F9S14

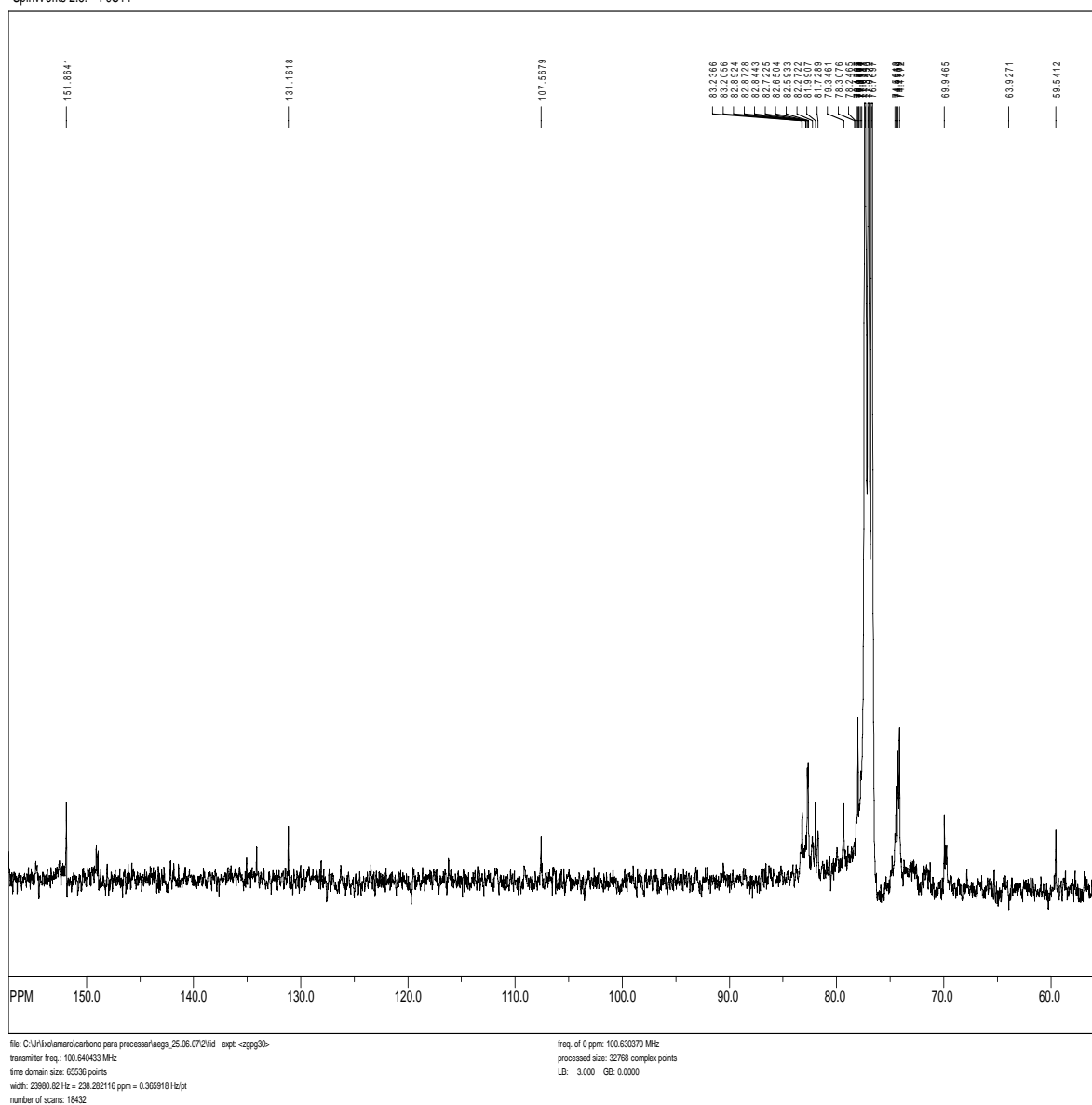


file: E:\RMN\fid\ expt <ag30>  
 transmitter freq.: 400.202471 MHz  
 time domain size: 65536 points  
 width: 8278.15 Hz = 20.684894 ppm = 0.126314 Hz/pt  
 number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 400.200003 MHz  
 processed size: 32768 complex points  
 LB: 0.000 GB: 0.0000

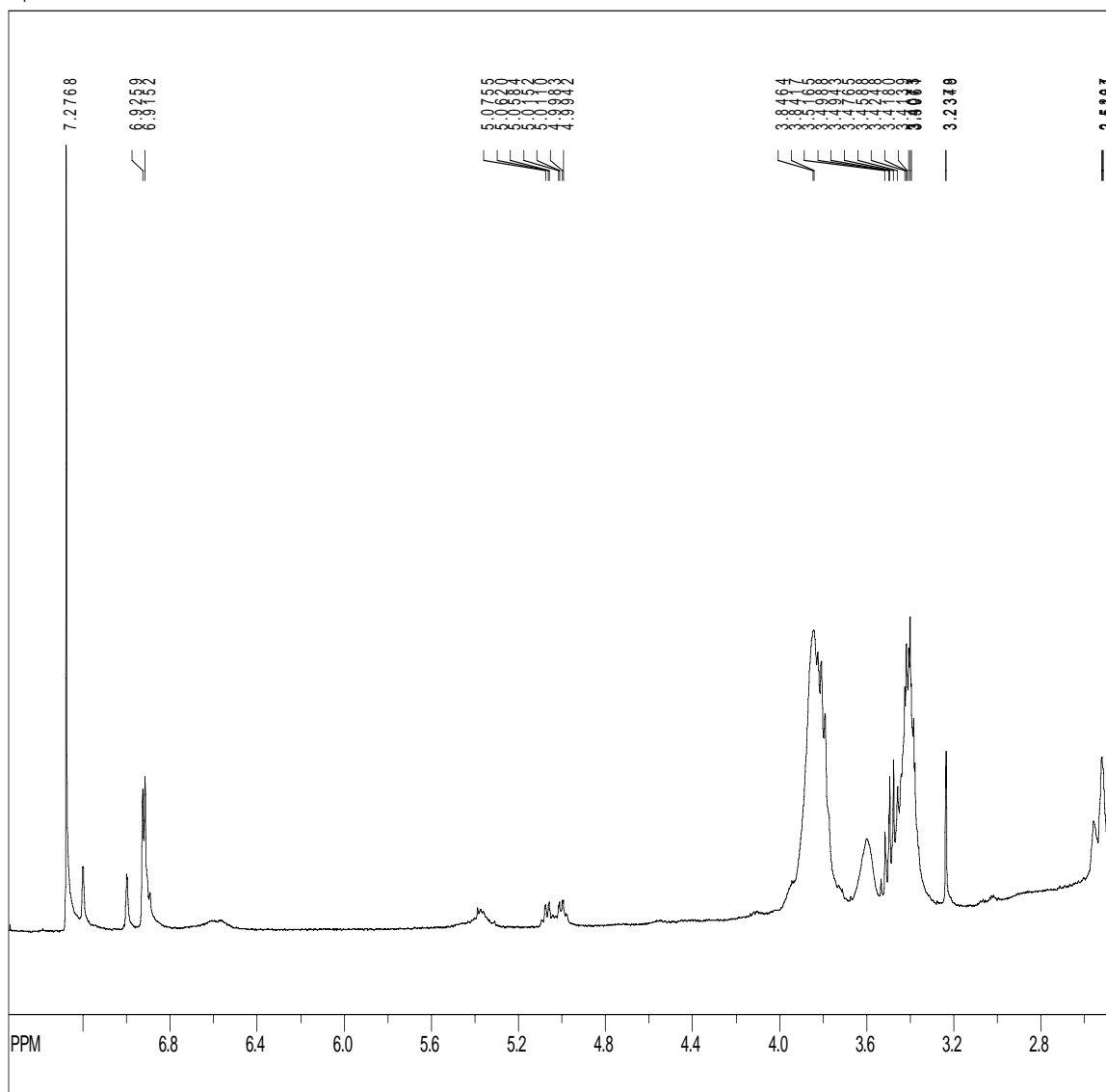
**Anexo 9. Expectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra(A13) F12F9S14.**

SpinWorks 2.5: F9S14



**Anexo 10.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A11)F12F3+4S13

SpinWorks 2.3: F12S13

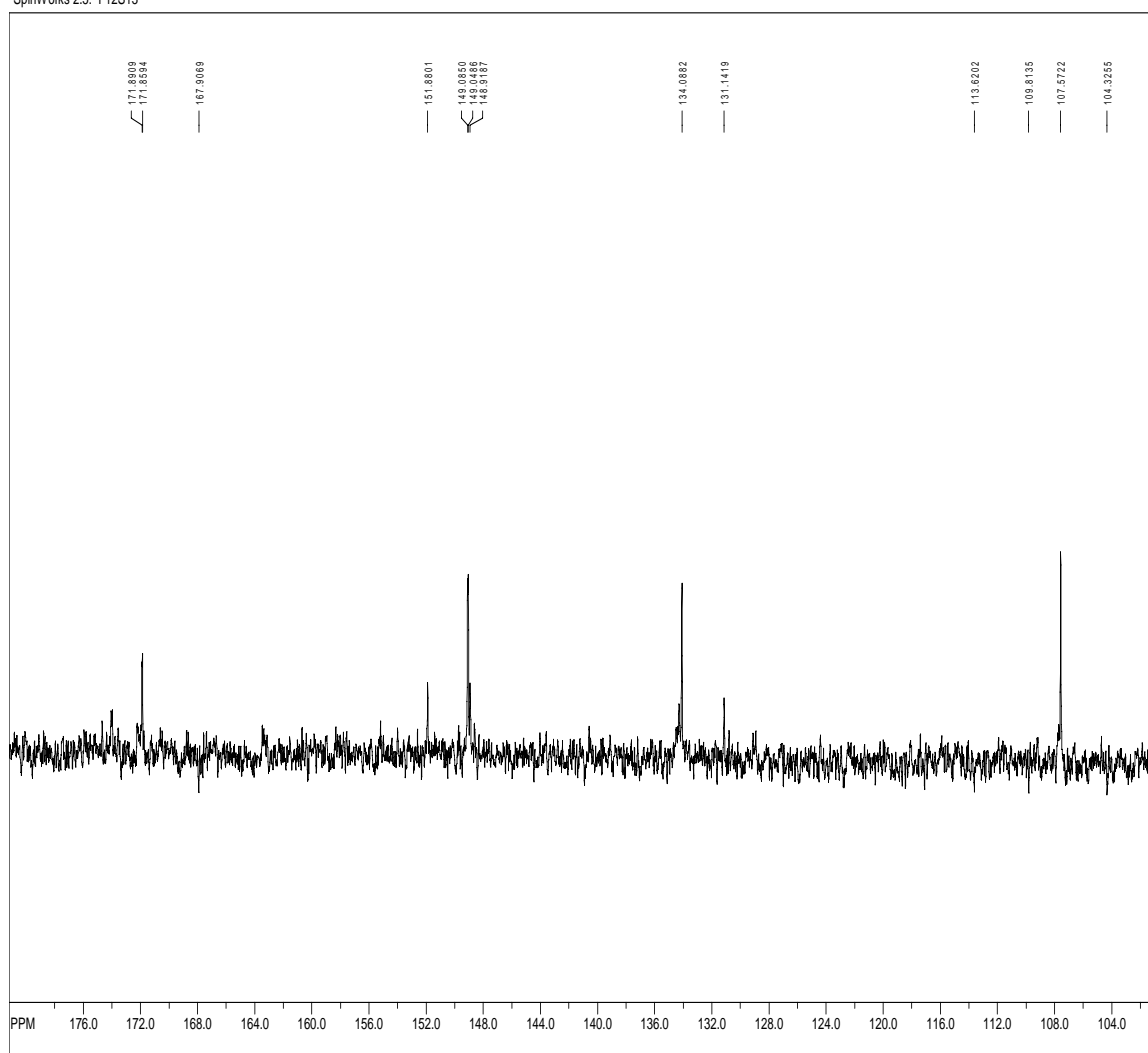


file: E:\RMN4\fid\_ expt <zg30>  
transmitter freq.: 400.202471 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8278.15 Hz = 20.684894 ppm = 0.126314 Hz/pt  
number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 400.200000 MHz  
processed size: 32768 complex points  
LB: 0.300 GB: 0.0000

**Anexo 11. Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra (A11) F12F3+4S13**

SpinWorks 2.5: F12S13



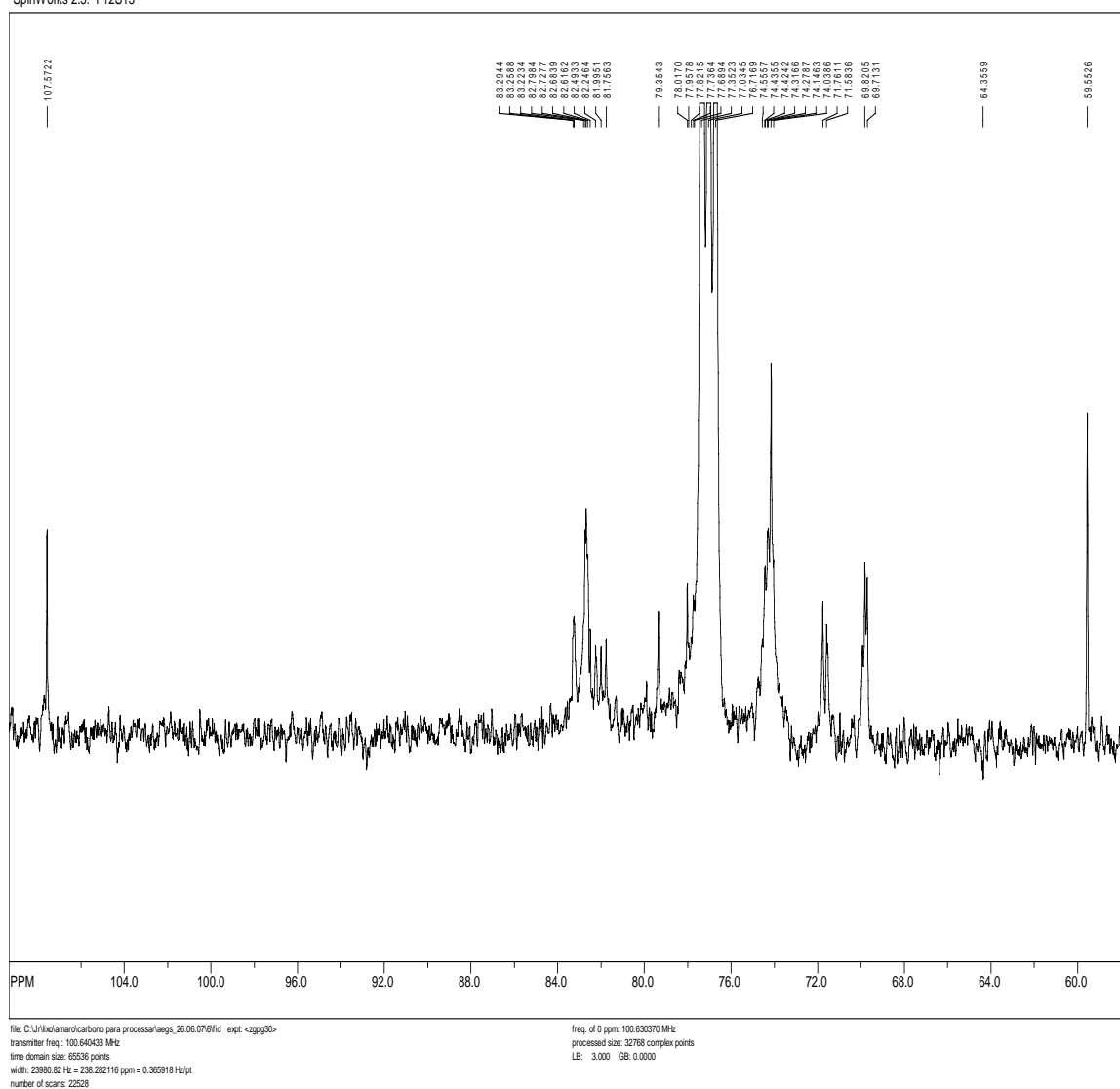
file: C:\liloi\amaril\carbono para processar\aeags\_26.06.07\6\fid\_ exp1\_ <agg90>  
transmitter freq.: 100.640433 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 23980.82 Hz = 238.262116 ppm = 0.365918 Hz/pt  
number of scans: 22528

freq. of 0 ppm: 100.630370 MHz  
processed size: 32768 complex points  
LB: 3.000 GB: 0.0000



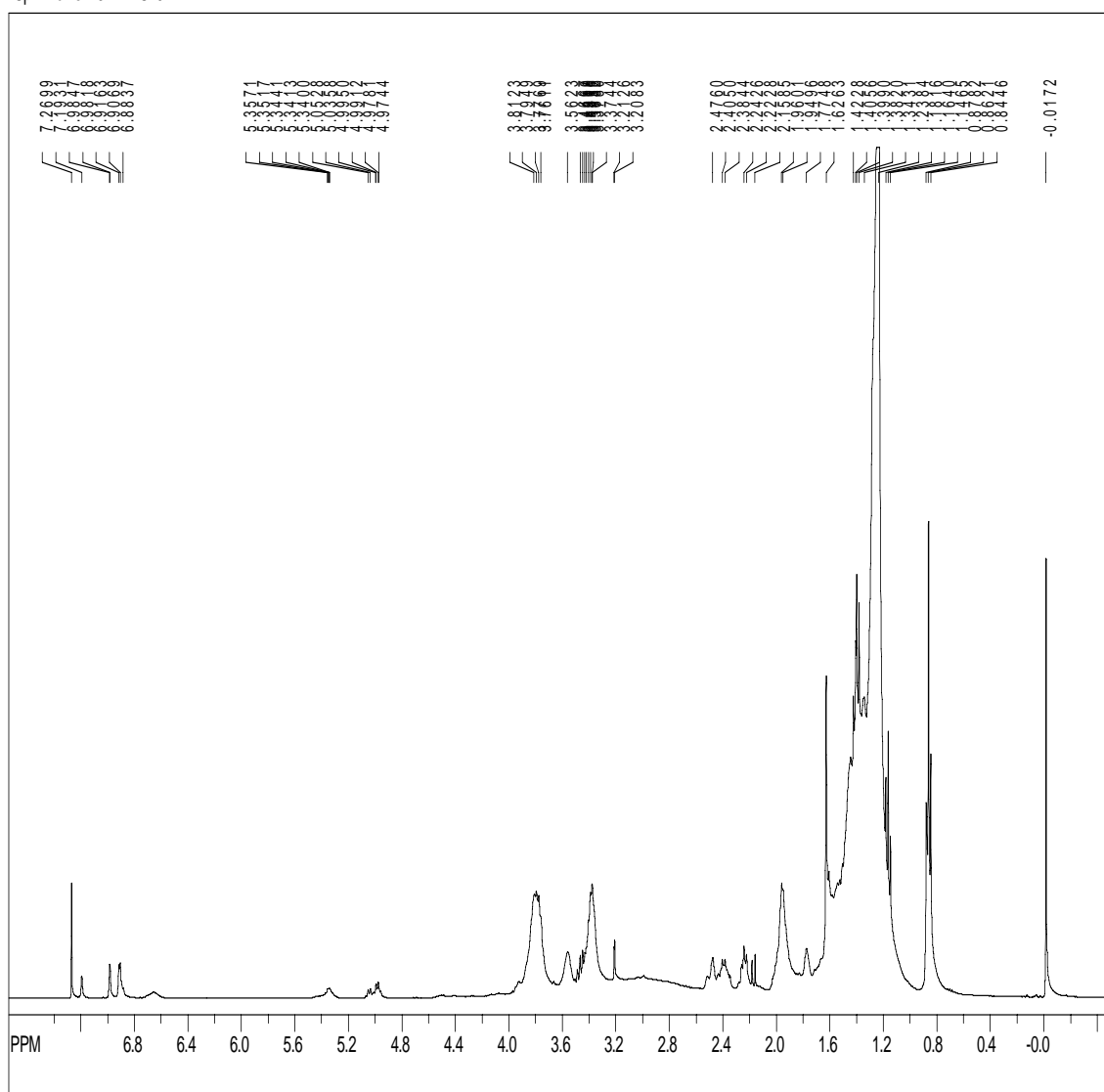
**Anexo 12.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra (A11) F12F3+4S13(2<sup>a</sup>. parte).

SpinWorks 2.5: F12S13



**Anexo 13.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A6) F12S15

SpinWorks 2.3: F12S15

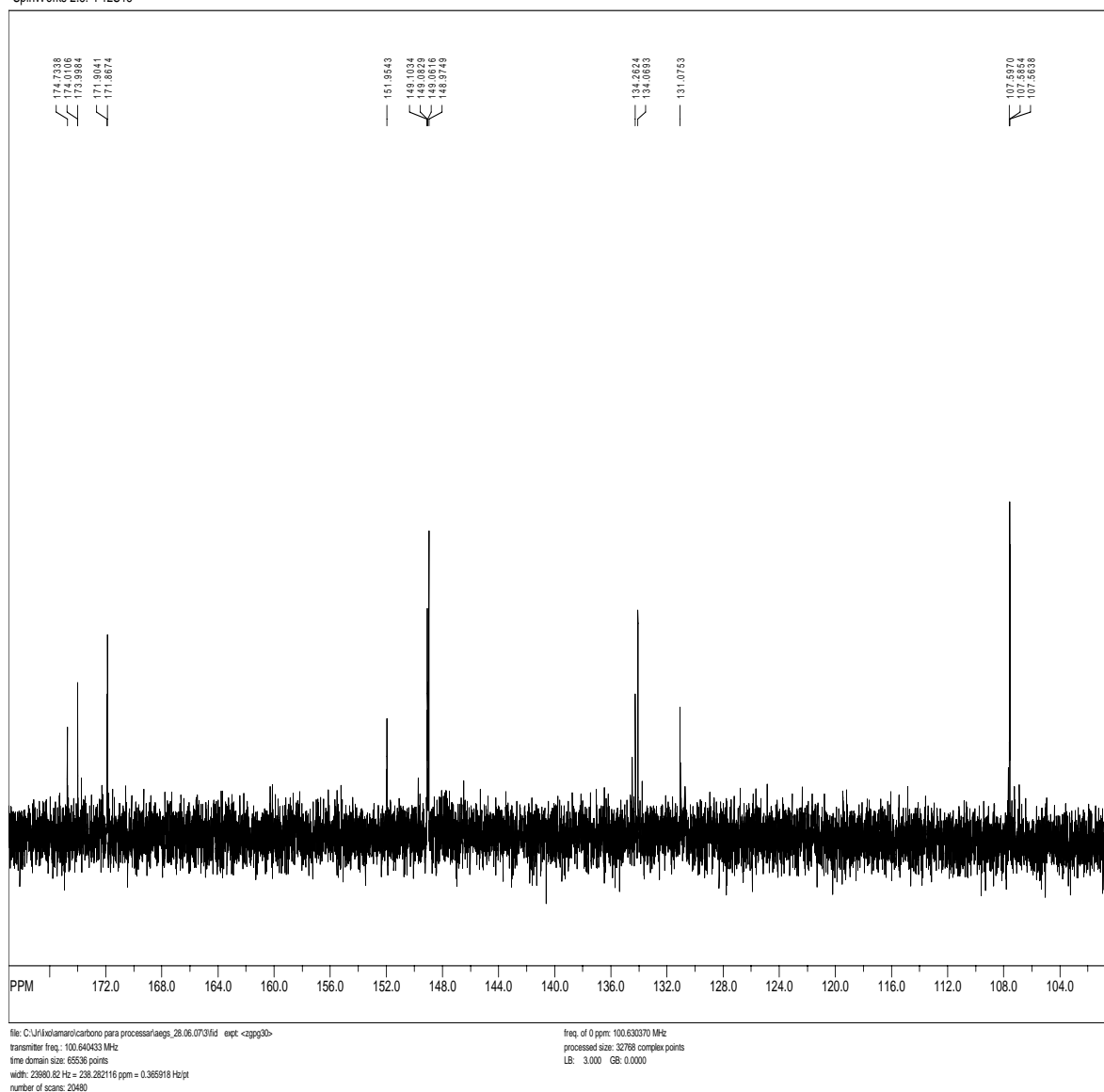


file: E:\RMN5fid exp1 <cg30>  
transmitter freq.: 400.202471 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8278.15 Hz = 20.684894 ppm = 0.126314 Hz/pt  
number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 400.200003 MHz  
processed size: 32768 complex points  
LB: 0.300 GB: 0.0000

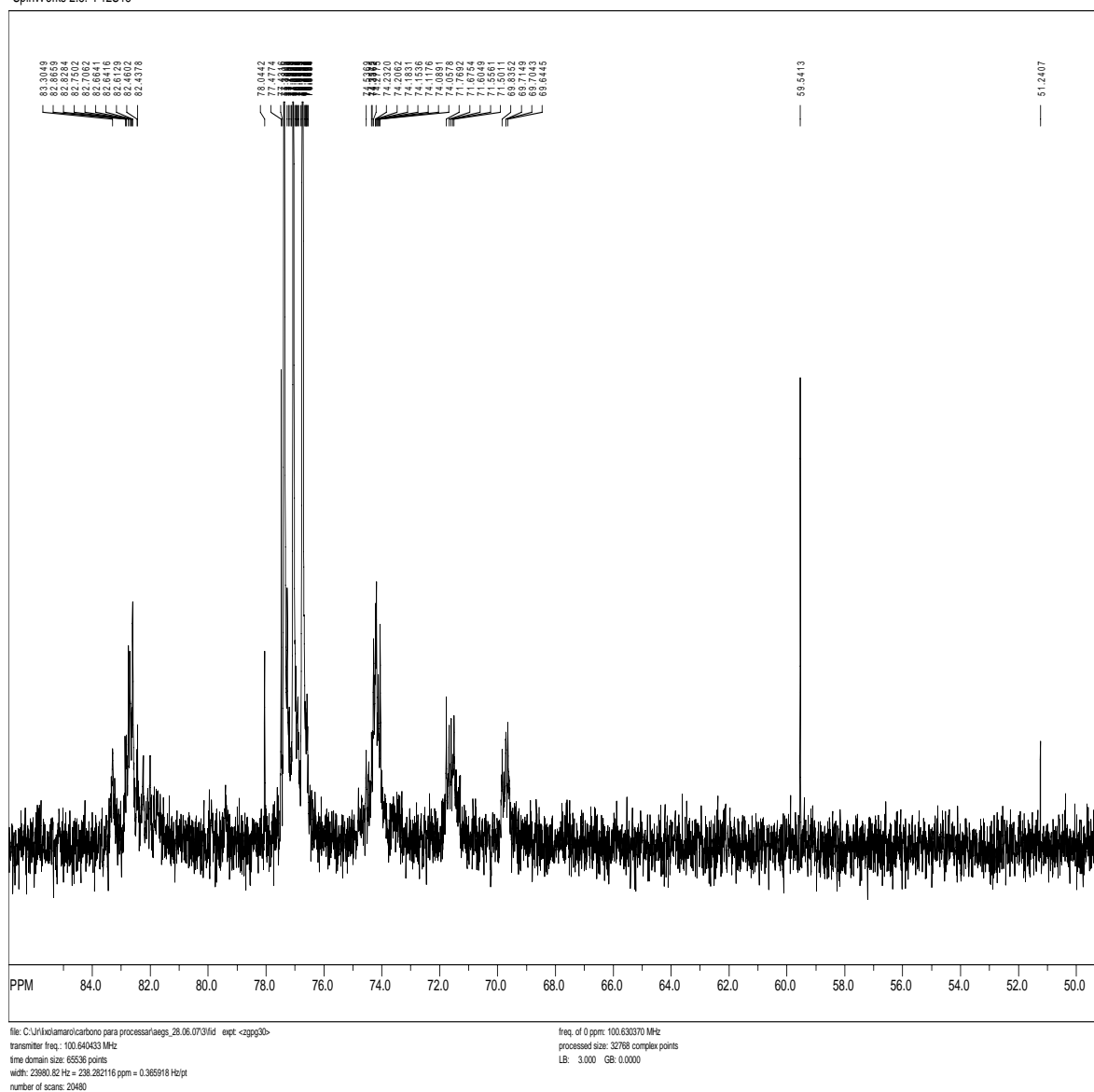
**Anexo 14.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra (A6) F12S15.

SpinWorks 2.5: F12S15



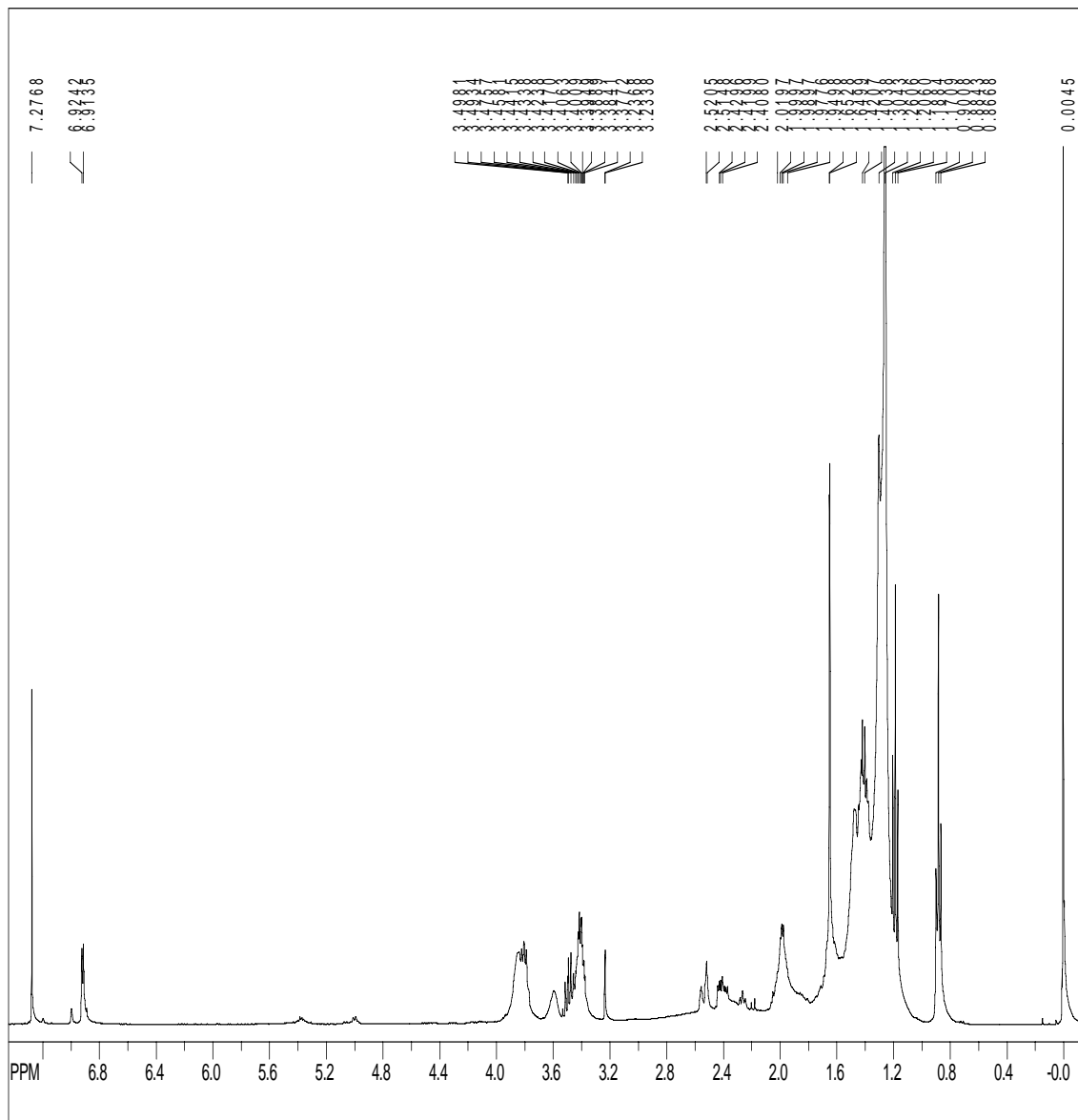
### Anexo 15. Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra (A6) F12S15(2ª. parte).

SpinWorks 2.5: F12S15



**Anexo 16.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A10) F12S36S30.

SpinWorks 2.3: F12S36



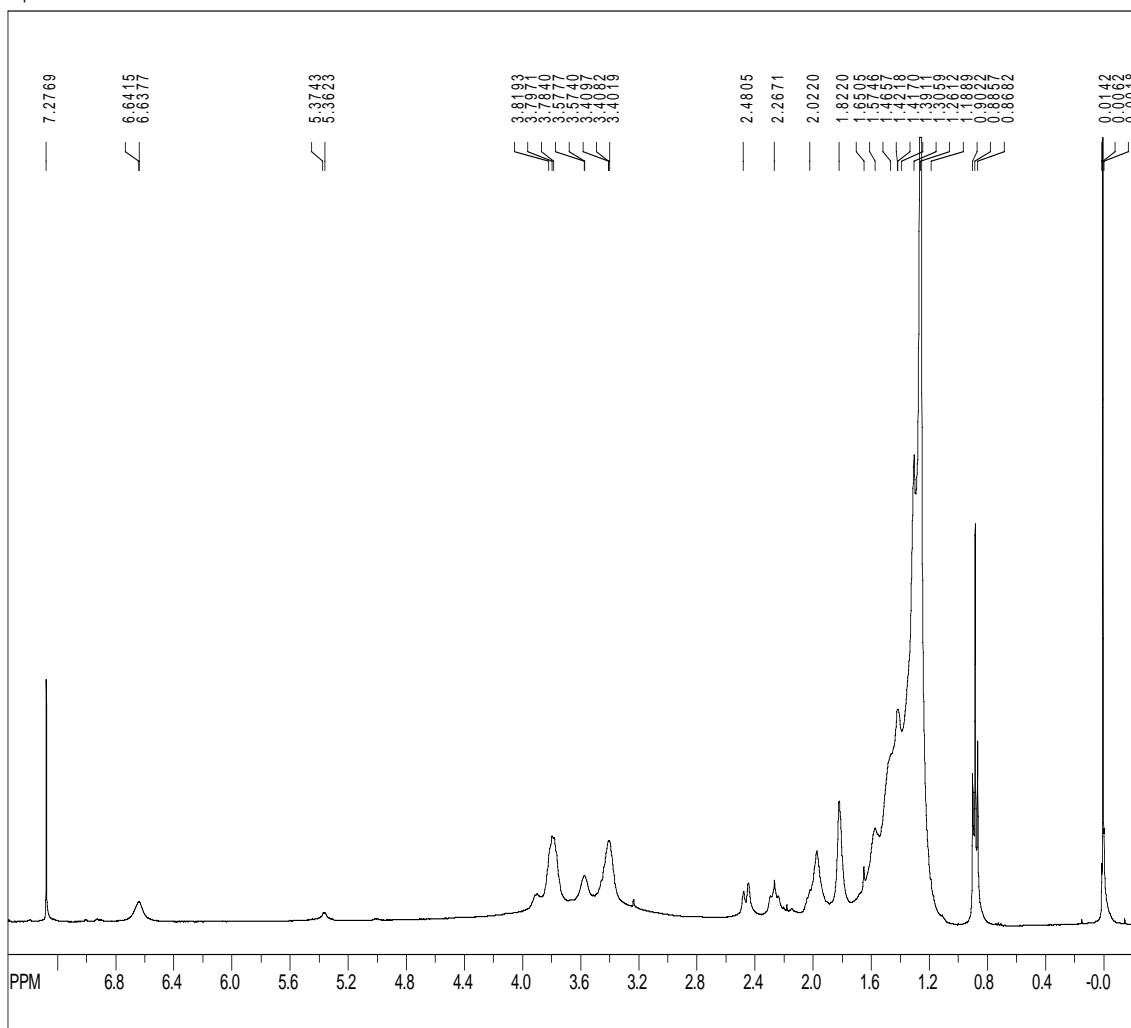
file: E:\RMN7\fid - expt - <zg30>  
transmitter freq.: 400.202471 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8278.15 Hz = 20.684894 ppm = 0.126314 Hz/pt  
number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 400.200000 MHz  
processed size: 32768 complex points  
LB: 0.300 GB: 0.0000



**Anexo 18.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A12) F12S17

SpinWorks 2.3: F12S17

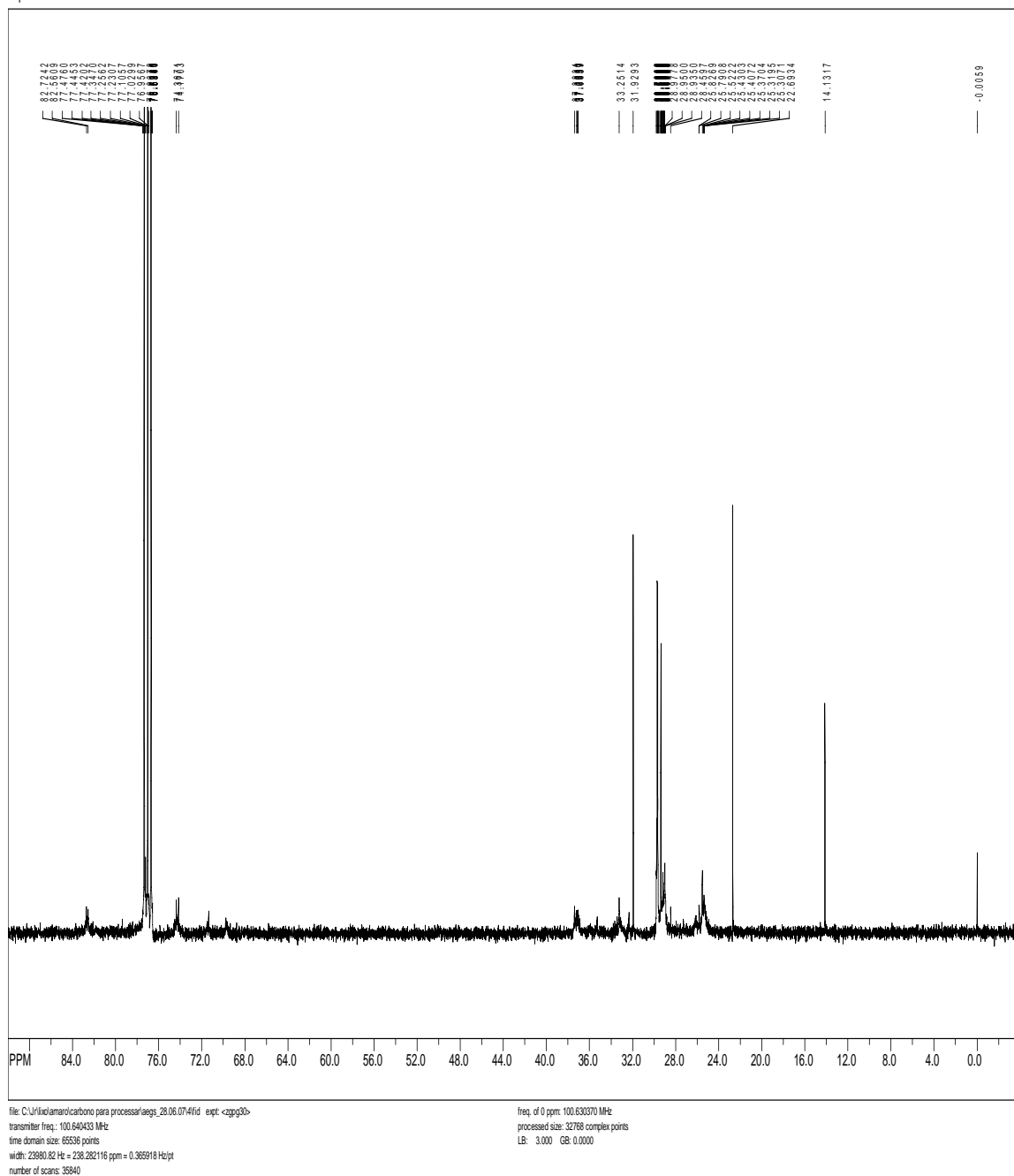


file: E:\RMN6fid\ exp. <zg30>  
transmitter freq.: 400.202471 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8278.15 Hz = 20.684894 ppm = 0.126314 Hz/pt  
number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 400.200000 MHz  
processed size: 32768 complex points  
LB: 0.300 GB: 0.0000

### Anexo 19. Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra (A12) F12S17 .

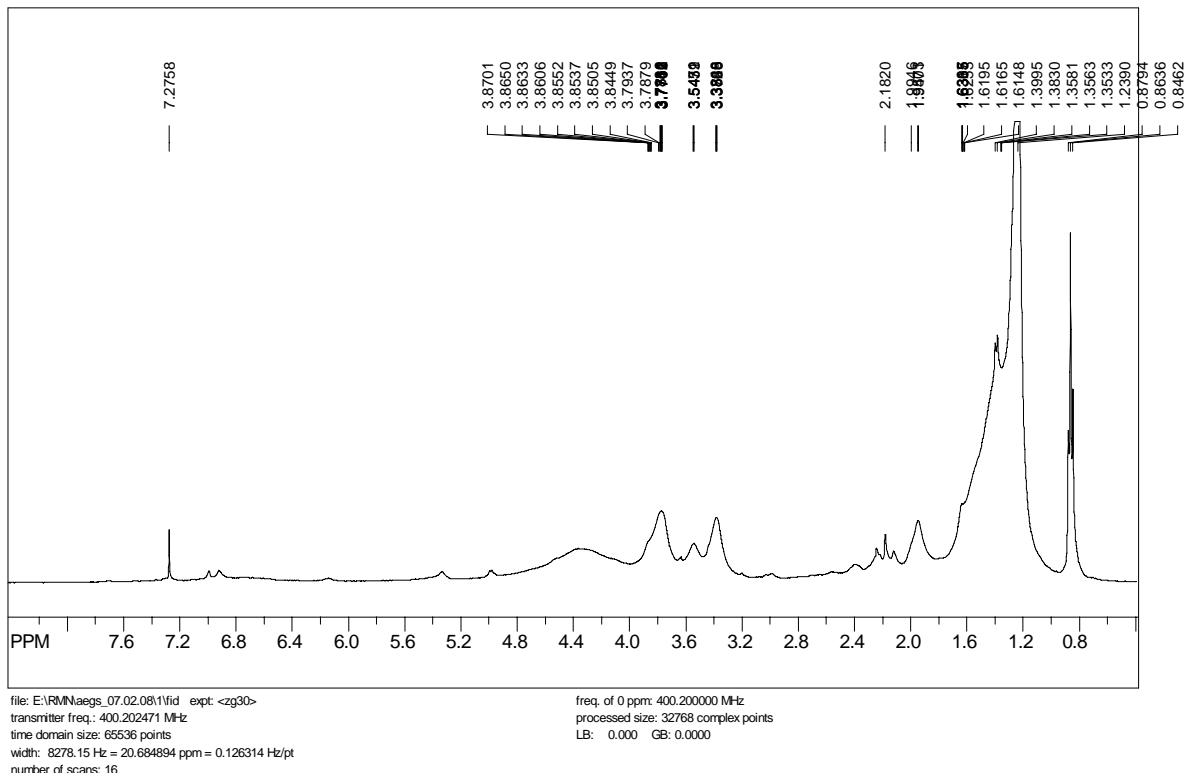
SpinWorks 2.5: F12S17





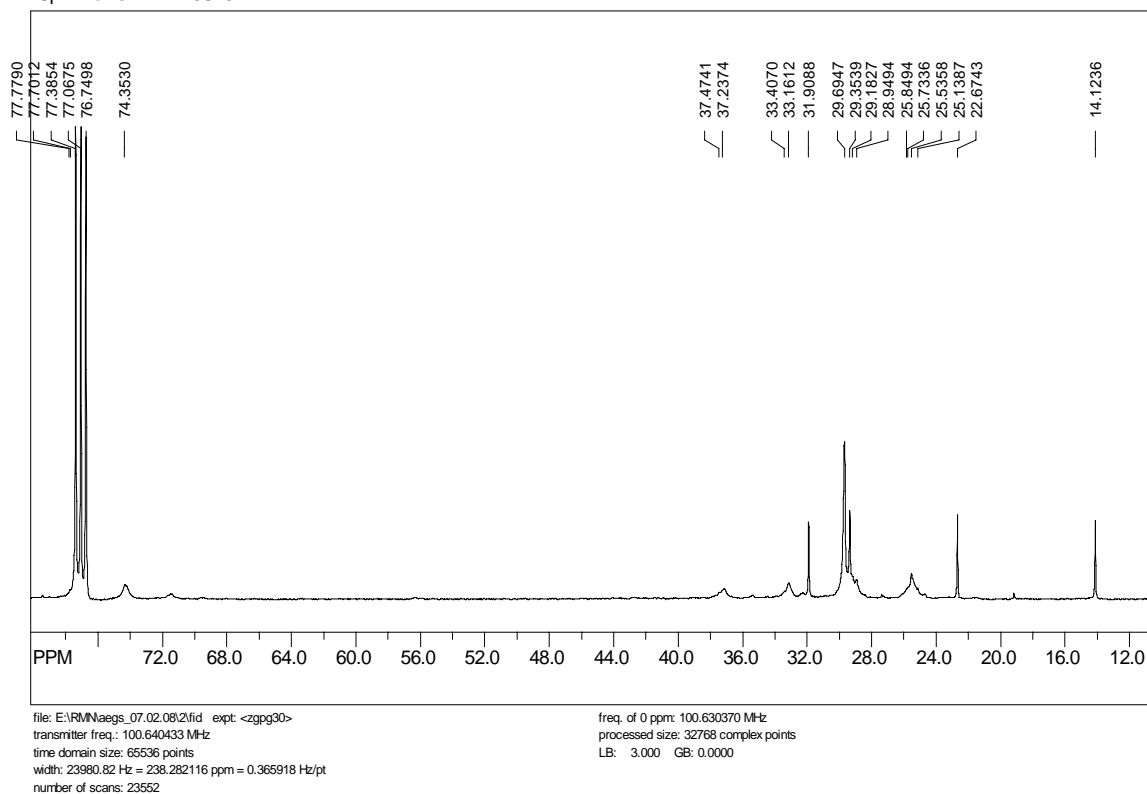
### Anexo 20. Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A3) F10S20.

SpinWorks 2.2: F10S20



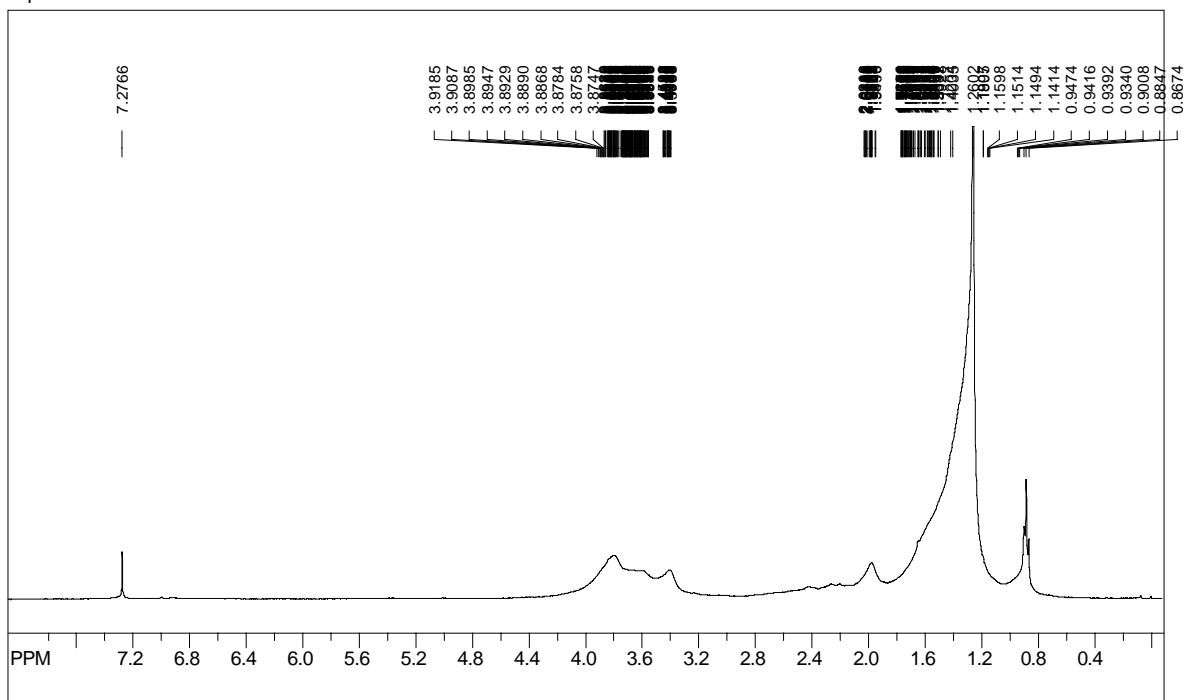
### Anexo 21. Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra (A3) F10S20.

SpinWorks 2.2: F10S20



### Anexo 22. Espectro de RMN<sup>1</sup>H da amostra (A7) F12S09.

SpinWorks 2.2: F1209

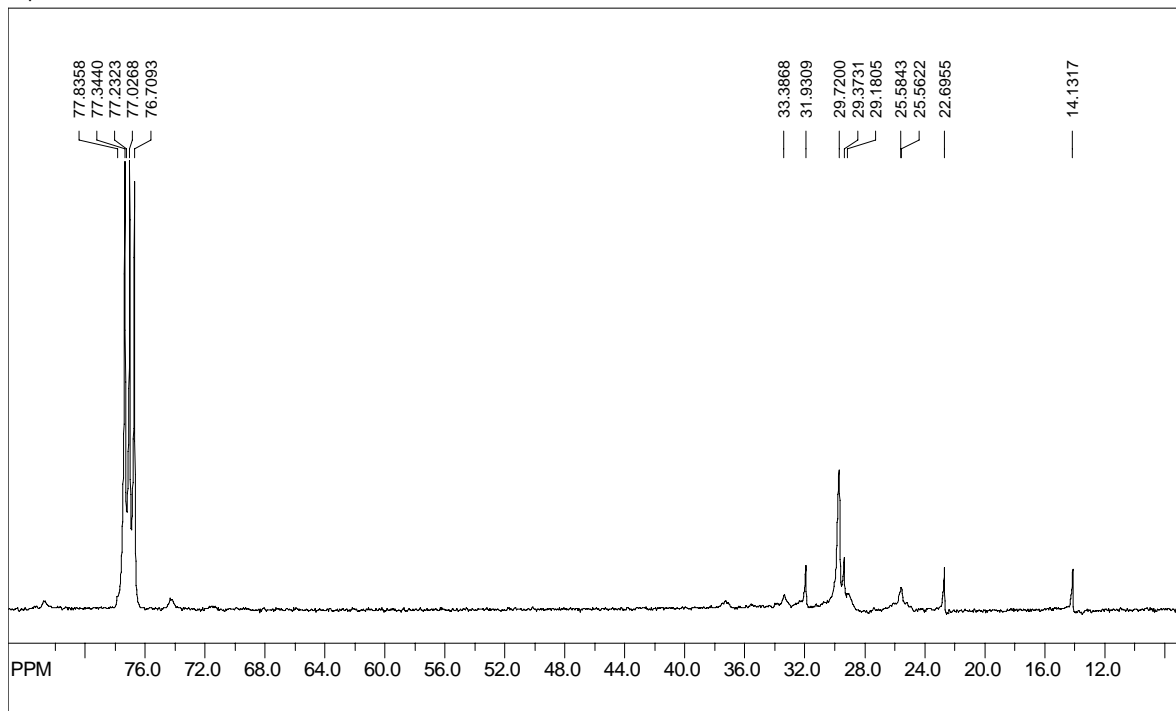


file: E:\RMN\aeigs\_11.02.08\1\fid exp: <zg30>  
 transmitter freq.: 400.202471 MHz  
 time domain size: 65536 points  
 width: 8278.15 Hz = 20.684894 ppm = 0.126314 Hz/pt  
 number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 400.200000 MHz  
 processed size: 32768 complex points  
 LB: 0.300 GB: 0.0000

### Anexo 23. Espectro de RMN<sup>13</sup>C da amostra(A7) F12S09.

SpinWorks 2.2: F1209



file: E:\RMN\aeigs\_11.02.08\2\fid exp: <zgpg30>  
 transmitter freq.: 100.640433 MHz  
 time domain size: 65536 points  
 width: 23980.82 Hz = 238.282116 ppm = 0.365918 Hz/pt  
 number of scans: 18432

freq. of 0 ppm: 100.630370 MHz  
 processed size: 32768 complex points  
 LB: 3.000 GB: 0.0000