



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE PASTAS ENDODÔNTICAS À BASE DE EXTRATO
GLICÓLICO DE *Musa paradisiaca*
FRENTE A *Enterococcus faecalis*

MAURÍCIO BACARIN SILVA

MANAUS, 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MAURÍCIO BACARIN SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE PASTAS ENDODÔNTICAS À BASE DE EXTRATO
GLICÓLICO DE *Musa paradisiaca*
FRENTE A *Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde (área de concentração: Princípios Bioativos pró-saúde da diversidade Amazônica), da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido

MANAUS, 2011

MAURÍCIO BACARIN SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE PASTAS ENDODÔNTICAS À BASE DE EXTRATO
GLICÓLICO DE *Musa paradisiaca*
FRENTE A *Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde (área de concentração: Princípios Bioativos pró-saúde da diversidade Amazônica), da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em _____

Banca Examinadora

Profa Dra Maria Lúcia Belém Pinheiro
Universidade Federal do Amazonas

Profa Dra Luciana Leomil
Universidade Estadual do Amazonas

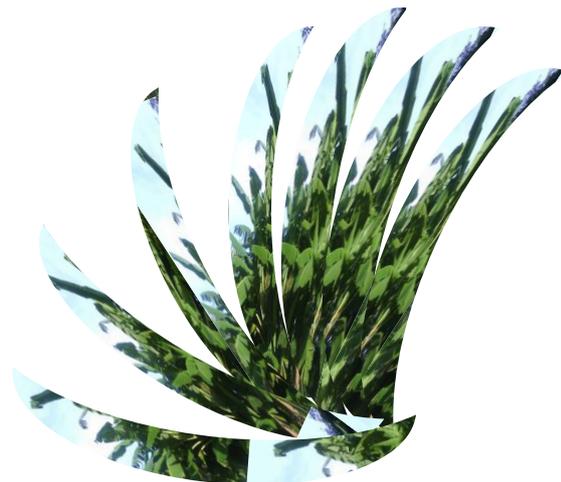
Profa Dra Ângela Delfina Bittencourt Garrido
Universidade Federal do Amazonas

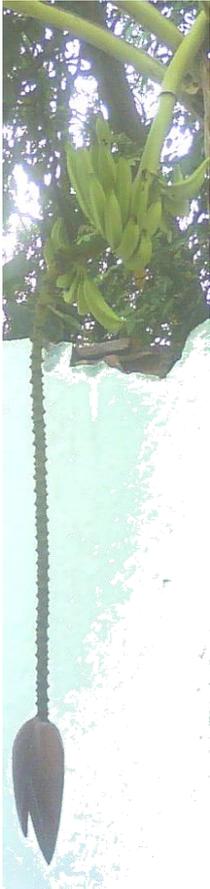


Nascestes no lar que precisavas, vestistes o corpo físico que merecias,
Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu adiantamento.
Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades, nem mais,
nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização.
Teus parentes, amigos são as almas que atraíste, com tua própria afinidade.
Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo
que te rodeia a existência.
Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos e atitudes...
São as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência.
Não reclames nem te faças de vítima.
Antes de tudo, analisa e observa.

A mudança está em tuas mãos.
Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor.
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um Novo Fim.

Chico Xavier





DEDICATÓRIA

O segredo da alma está no coração.

Podemos usar a razão para provar nossos ideais, mas apenas a alma que transborda amor pode criar os meios para vencer as gratificantes batalhas da vida.

Dedico esse trabalho a DEUS que move minha alma e que presenteou meu coração com o meu amor: Michelle.



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa Dra Ângela Garrido em cuja competência e inteligência procurei me espelhar e aprender o máximo possível. Sempre disposta a atender prontamente a todas as solicitações, inclusive em momentos inesperados, com um sorriso afável e amigo. Seu bom humor inspira confiança para enfrentar qualquer obstáculo.

Agradeço a Profa Dra Luciana Leomil que deu oportunidade de aprender muito mais da prática laboratorial em Microbiologia, mostrando paciência em explicar o que fosse necessário. Muito dedicada ao trabalho e capaz de contagiar com sua experiência profissional todos aqueles que estão ao seu lado, fraternalmente.

Agradeço a Profa Dra Maria Lúcia Belém pela disposição em apresentar a Química como se fosse seu mais querido filho. Sua presença emana Paz e Humildade, explicitando gentilmente os caminhos corretos a seguir.

Agradeço a Profa Dra Cecília Verônica Nunez que me acolheu e orientou-me, um estranho desconhecido, abrindo as portas de seu laboratório no INPA.

Agradeço ao Prof Dr Afonso Duarte Leão de Souza que possibilitou a agregação de novos conhecimentos sobre técnicas biomoleculares importantes para este estudo.

Agradeço ao Prof Dr Diego Ferreira Regalado que levantou aspectos importantes em minha Qualificação e foi sincero e objetivo. Alguém com quem sempre pude contar, ajudando-me sem olhar hora ou lugar. Um abraço, meu amigo.

Agradeço a Profa Dra Neylla Teixeira Sena que se dispôs a esclarecer dúvidas que estivessem presentes, mostrando seu coleguismo e simpatia.

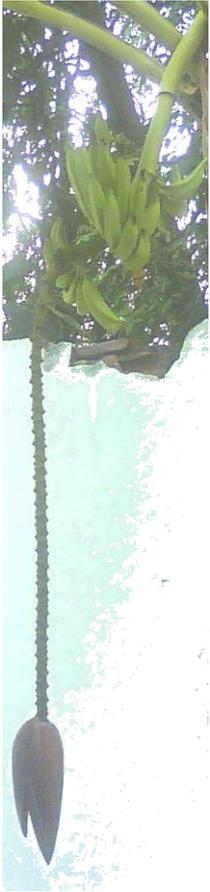
Agradeço ao Prof Dr Rodrigo César que deu primorosas sugestões que foram importantes para este estudo.

Agradeço ao Prof Dr Edmar Vaz de Andrade que se mostrou um exímio docente, com caráter ético e tolerante.

Agradeço a Mirna Sayuri, com quem aprendi a rir dos meus próprios erros e permanecer motivado a continuar: a insistência me trouxe até aqui. Obrigado pela paciência e pelo carinho.

Agradeço a Luciana Falcão que dividiu sua bancada comigo e mostrou calma e tranquilidade para resolver qualquer problema.

Agradeço ao Edson que estava no Centro de Apoio Multidisciplinar amparando e ensinando o que fosse preciso.





Agradeço aos meus pais, Edna e Djalma, que são exemplos de trabalho e dedicação, sem os quais poderia não ter conseguido. Amo vocês!

Agradeço a minha família pelos momentos de conforto e carinho.

Agradeço aos amigos de todas as horas que me ajudaram a reabastecer as energias com diversão.

Agradeço aos companheiros de mestrado: dividimos nossos problemas, fortalecemos nossa união e encontramos o caminho da vitória.

Agradeço aos colegas de trabalho que compreenderam os momentos que estive ausente e incentivaram-me para vencer mais esse desafio.

Agradeço ao Nerilsom Marques pelo auxílio na bioquímica experimental e interpretação da RMN, que foi essencial para este estudo, com muita boa vontade e companheirismo.

Agradeço a Jaciara Lira pelo seu espírito de camaradagem e pela ajuda, paciência e simplicidade em apresentar as técnicas cromatográficas.

Agradeço ao Felipe que teve papel importante para ajudar na interpretação da Espectrometria de Massas.

RESUMO

Os produtos de *Musa paradisiaca* (bananeira) são usados como sedativo para dor de dente, cicatrizante de feridas cirúrgicas de exodontia, úlcera gástrica, hipoglicemiante, antídoto para picada de cobras, diarreia entre outras indicações em comunidades que têm por tradição o uso das plantas como medicina alternativa. Na Endodontia, almeja-se uma medicação intracanal ideal contra cepas resistentes em infecções endodônticas refratárias. Por esse motivo, o objetivo desse trabalho foi testar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Musa paradisiaca* sobre *Enterococcus faecalis*. Para realizar o experimento, o extrato glicólico de *Musa paradisiaca* substituiu o Polietileno glicol 400, que é um veículo que compõe algumas pastas endodônticas usadas como medicação intracanal. Foi utilizado o teste de difusão em Ágar, pelo método do poço, para a avaliação da atividade antimicrobiana contra a cepa de *Enterococcus faecalis* normalmente relacionada a infecções refratárias endodônticas. Foram inseridos nos poços diferentes materiais que caracterizam os seguintes grupos em duas etapas experimentais. Experimento “A”: Grupo 1, Polietileno glicol 400 (PEG 400 - controle negativo); Grupo 2, PEG 400 e Hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$); Grupo 3, Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB); Grupo 4, EGB e $\text{Ca}(\text{OH})_2$; Grupo 5, gel de Clorexidina 2% (CHX – controle positivo). Experimento “B”: Grupo 1, PEG 400 (controle negativo); Grupo 2, PEG 400 e Óxido de zinco (ZnO); Grupo 3, PEG 400, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e ZnO; Grupo 4, EGB e ZnO; Grupo 5, EGB, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e ZnO; Grupo 6, CHX (controle positivo). Após incubação, as medições dos halos de inibição foram realizadas após 18 horas com uma régua milimetrada. Apenas a pasta de EGB e ZnO obteve atividade antimicrobiana estatisticamente significativa com resultados similares ao controle positivo e foi submetida à macrodiluição para que fosse verificada a concentração inibitória mínima, mas nenhuma diluição da pasta foi capaz de evitar o crescimento de *E. faecalis*. Esses dados foram tratados estatisticamente a 95% de significância usando o teste de Mann-Whitney e a Estatística Descritiva. A composição do EGB foi avaliada por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray e foi verificado que um dos componentes majoritários poderia ser a maltose. A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi realizada nas fases de acetato de etila, diclorometano e aquosa resultantes da partição líquido/líquido realizada no EGB, depois de seco em capela. A CCD sugeriu a presença de flavonóides, terpenos, taninos e esteróides no EGB. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear foi realizada com o propósito de supor a composição do EGB e foi observado grande número de picos de sinais na região referente aos glicosídeos, assim como picos referentes à estrutura molecular de terpenos e um sinal característico de esteróides. O EGB apresentou atividade antimicrobiana quando associado ao ZnO, podendo ser uma propriedade importante para a composição de um novo medicamento intracanal. Todo novo biomaterial baseado na etnobotânica deve ser testado criteriosamente para viabilizar sua aplicabilidade clínica, o que justificou a pertinência deste estudo preliminar, no entanto testes físico-químicos e de biocompatibilidade são imprescindíveis para futuro emprego de fitoterápicos na Endodontia.

Palavras Chave: Medicação Intracanal. Atividade Antimicrobiana. *Musa paradisiaca*. *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

The products of *Musa paradisiaca* (banana plantain) are used as a sedative for dental pain, healing of tooth extraction surgical wounds, gastric ulcer, hypoglycemic, antidote for snake bites, diarrhea among other indications in communities that have a tradition of using plants as alternative medicine. In Endodontics, it aspires to be an ideal intracanal medicament against resistant strains in refractory endodontic infections. Therefore, the objective of this study was to test the antimicrobial activity of *Musa paradisiaca* glycolic extract. To perform the experiment, the *Musa paradisiaca* glycolic extract replaced Polyethylene glycol 400, which is a vehicle that makes up some pastes used as Endodontic intracanal medication. Well agar diffusion test was used to evaluate the antimicrobial activity against strains of *Enterococcus faecalis* usually related to refractory endodontic infections. Different materials were inserted in wells in two experimental steps as characterized in the following groups. Experiment "A": Group 1, Polyethylene glycol 400 (PEG 400 - negative control); Group 2, PEG 400 and calcium hydroxide (Ca(OH)₂); Group 3, *Musa paradisiaca* Glycolic Extract (EGB); Group 4, EGB and Ca(OH)₂; Group 5, 2% chlorhexidine gel (CHX - positive control). Experiment "B": Group 1, PEG 400 (negative control); Group 2, PEG 400 and zinc oxide (ZnO); Group 3, PEG 400, Ca(OH)₂ and ZnO; Group 4, ZnO and EGB; Group 5, EGB, Ca(OH)₂ and ZnO; Group 6, CHX (positive control). After incubation, measurements of inhibition zones were performed after 18 hours with a millimeter ruler. Just EGB and ZnO paste obtained statistically significant antimicrobial activity with similar results to the positive control and was subjected to macrodilution, a finding for minimum inhibitory concentration, but no dilution of the paste was able to prevent the growth of *E. faecalis*. These data were treated statistically at 95% significance using the Mann-Whitney test and Descriptive Statistics. The composition of EGB was assessed by Mass Spectrometry with Electrospray Ionization and it was found that one of the major components could be maltose. Thin Layer Chromatography (TLC) was carried out in phases of ethyl acetate, dichloromethane and aqueous partition resulting from liquid/liquid held in EGB, after drying under a hood. TLC suggested the presence of flavonoids, terpenes, tannins and steroids in EGB. The Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy was performed in order to also propose the composition of EGB and observed a large number of signal peaks in the region concerning the glycosides, as well as peaks corresponding to the structure of terpenes and a few characteristic of steroids. The EGB showed antimicrobial activity when combined with ZnO and can be an alternative to the composition of an intracanal medication. Every new biomaterial based on ethnobotany should be carefully tested to allow its clinical applicability, which justified the relevance of this preliminary study; however physico-chemical and biocompatibility tests are essential to future employment of herbal medicines in Endodontics.

Keywords: Intracanal Medication. Antimicrobial Activity. *Musa paradisiaca*. *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Bananeira	24
Figura 2	Parâmetros utilizados para a determinação da maturação do fruto da banana	25
Figura 3	Bananeira: coração surgindo do cacho de bananas	28
Figura 4	Diagrama da bananeira	31
Figura 5	Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i>	72
Figura 6	Macrodiluição	79
Figura 7	Componentes de um Espectrômetro de Massas	81
Figura 8	Processo de ionização por Electrospray	83
Figura 9	Espectrômetro de Massas e Injetor da Amostra em detalhe	84
Figura 10	Cromatoplasas de sílica	86
Figura 11	Experimento “A”	89
Figura 12	Detalhe do Experimento “A”	90
Figura 13	Experimento “B”	91
Figura 14	Variação dos halos de inibição em milímetros obtidos para as respectivas pastas nos experimentos “A” e “B”	92
Figura 15	Concentração Inibitória Mínima	94
Figura 16	Gráfico de dispersão de valores de transmitância	95
Figura 17	Oligômeros da maltose	95
Figura 18	Espectrometria de Massas modo positivo	96
Figura 19	Espectrometria de Massas modo negativo	97
Figura 20	Espectrometria de Massas	98
Figura 21	Secagem do Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i> na capela	99
Figura 22	Partição líquido/líquido do Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i>	99
Figura 23	Fases depois de secagem na estufa	100
Figura 24	Análise da CCD da Fase de Acetato de Etila	100
Figura 25	Análise da CCD da Fase Aquosa	101
Figura 26	Análise da CCD da Fase Aquosa	102
Figura 27	Análise da CCD da Fase Diclorometano	102
Figura 28	Análise da CCD da Fase Diclorometano	103
Figura 29	Análise da CCD realizada no CBA	104
Figura 30	Espectro de RMN de ^1H da fase de Diclorometano em D_2O	104
Figura 31	Espectro de RMN de ^1H da fase de Acetato de Etila em D_2O	105
Figura 32	Espectro de RMN de ^1H da fase aquosa em D_2O	106

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Valores dos dados estatísticos obtidos dos valores dos halos de inibição	92
Tabela 2	Comparativo dos testes difusão em ágar dos experimentos não nulos	93
Quadro 1	Composição das amostras de cada grupo a ser testado no experimento “A”	76
Quadro 2	Composição das amostras de cada grupo a ser testado no experimento “B”	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	“American Type Culture Collection”
BHI	Meio de cultura cérebro-coração
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CHX	Clorexidina
CIM	Concentração inibitória mínima
CTR	Cetrimida
EGB	Extrato Glicólico de <i>Musa paradisíaca</i>
LB	Luria Bertani
MHA	Müeller – Hinton Ágar
MHB	Müeller – Hinton Broth
PEG 400	Polietileno glicol 400
PMCC	Paramoclorofenol Canforado
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Luz Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 A Etnobotânica e a <i>Musa paradisiaca</i>: de Planta Medicinal a Fitoterápico	22
2.2 Medicação Intracanal	46
2.3 O papel de <i>Enterococcus faecalis</i> no Biofilme Polimicrobiano Endodôntico	55
3. OBJETIVOS	70
3.1 Objetivo Geral	70
3.2 Objetivos Específicos	70
4. METODOLOGIA	71
4.1 Modelo de estudo	71
4.2 Materiais	71
4.2.1 Extrato Fitoterapêutico	71
4.2.2 Linhagem Microbiana	73
4.2.3 Meios de Cultura	73
4.3 Métodos	73
4.3.1 Difusão em Ágar	73
4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Macrodiluição	77
4.3.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray- ESI-MS	80
4.3.4 Cromatografia em Camada Delgada	84
4.3.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear - RMN	88
4.4 Análise de Dados	88
5. RESULTADOS	89
5.1 Teste de Difusão em Ágar	89
5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Macrodiluição	93
5.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray	95
5.4 Cromatografia por Camada Delgada - CCD	98
5.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	104
6. DISCUSSÃO	107
7. CONCLUSÃO	118
8. REFERÊNCIAS	119
9. APÊNDICES	130
10. ANEXOS	133

1. INTRODUÇÃO

O órgão dentário é acometido pela cárie em vários estágios e, dependendo do nível de destruição, um tratamento diferente é indicado, desde a prevenção até a reabilitação oral. A Endodontia é uma especialidade da Odontologia que estuda a etiologia, o diagnóstico, a prevenção e o tratamento das patologias pulpares e periapicais. Com esse intuito, o tratamento endodôntico é indicado para a remoção e neutralização de todo o conteúdo do sistema de canais radiculares que esteja com uma reação inflamatória irreversível ou com microorganismos que produzem toxinas prejudiciais à polpa dentária e ao periápice (SIQUEIRA-JR et al., 2010).

A flora microbiana presente em comunidades no sistema estomatognático, em particular no sistema de canais radiculares possui características peculiares. As diferentes espécies de bactérias e fungos formam um biofilme, organizando-se por relações de mutualismo e comensalismo, como também antagonismo e competição. Essa estrutura comunitária propicia sempre um crescimento do biofilme, havendo um comportamento multicelular, com atividades coordenadas de interação e comunicação dos diversos microorganismos. Essa estrutura capacita sua sobrevivência mesmo em situações hostis (BRAGA, 2007; APARNA; YADAV, 2008; SIQUEIRA-JR et al., 2010).

Pelo fato do biofilme endodôntico ter sido pesquisado recorrentemente na literatura (FABRICIUS et al., 1982; SUNDQUIST, 1994; SEN et al., 1995; WALTIMO et al., 1997; BAUMGARTNER et al., 2000; HAAPASALO et al., 2000; ESTRELA et al., 2001; LOVE, 2001; VALERA et al, 2001; EVANS et al., 2002; FIDGOR et al., 2003; MICKEL et al., 2003; NAIR et al, 2005; STUART et al., 2006; DAVIS et al., 2007; PALLOTTA et al., 2007; SIQUEIRA-JR et al., 2010), verifica-se um importante patógeno na etiopatogenia das alterações pulpares e periapicais, o coco anaeróbio facultativo Gram positivo *Enterococcus*

faecalis. A distribuição heterogênea de micro-organismos nas patologias pulpares é evidente, no entanto tem sido recorrente a persistência da cepa de *E. faecalis*, especialmente depois de finalizada a terapia pulpar, como sendo o principal ator de infecções reincidentes, também chamadas refratárias, presente em mais de 90% dos casos e com prevalência bem menor em infecções primárias. Provavelmente essa diferença é dada à presença de outras cepas que não permitam sua disseminação nas infecções primárias (ESTRELA, 2000; SIQUEIRA-JR et al., 2010).

Um estudo realizado sugere que a adaptação de cepas de *Enterococcus faecalis* a ambientes alcalinos permite sua persistência como patógeno no sistema de canais radiculares. O micro-organismo apresenta mecanismos de controle interno da entrada e saída de metabólitos que mantêm viáveis enzimas vitais, mesmo em pH alto, feito por sua membrana citoplasmática (EVANS et al., 2002). O grau de invasão nos túbulos dentinários por essa cepa é considerado um mecanismo superior ao poder de dissociação de certas medicações intracanal (STUART et al, 2006), não permitindo a ação direta do hidróxido de cálcio, por exemplo, permanecendo em pH considerado subletal e adaptando-se às novas condições. O estresse causado pelo ambiente alcalino serve de estímulo para ativar outro mecanismo que a permite sobreviver com menor quantidade de nutrientes, gastando menos energia (EVANS et al., 2002). Os mesmos estímulos ativam fatores de virulência que auxiliam em sua reinfeção tardia, chegando a ser o agente etiológico de abscessos. Nesta situação existe a hipótese de uso do próprio macrófago do hospedeiro para se disseminar pelas vias sanguíneas e, como resiste à fagocitose, pode ser também responsável pela Endocardite Bacteriana (MATHEW et al., 2010; MA et al., 2011). É notória sua resistência a temperaturas elevadas, como também à antibioticoterapia, existindo relatos de sua suscetibilidade à vancomicina (JHAMB et al., 2010).

O Tratamento Endodôntico consiste de vários procedimentos operatórios com uma fase mecânica, representada pela aplicação das técnicas de instrumentação dos canais radiculares, outra física, que promove o movimento hidráulico pela injeção e aspiração da solução irrigadora, e também a fase química, que compõe a ação de substâncias químicas para combater micro-organismos presentes em túbulos dentinários e demais ramificações por meio de soluções irrigadoras e medicação intracanal, dentre outros atos operatórios, finaliza-se com a obturação do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA-JR et al., 2010).

A sanificação do sistema de canais radiculares é um tempo operatório imprescindível para o sucesso do tratamento endodôntico. O desafio de alcançar essa meta é grande, visto que a anatomia radicular dos elementos dentários propicia meios para os micro-organismos continuarem viáveis, mesmo após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares (HOCKETT et al., 2008; KISHEN et al., 2008). Portanto, a Endodontia atua no restabelecimento da saúde quando uma infecção está instalada, utilizando técnicas para debelar os agentes microbianos presentes no sistema de canais radiculares, sendo estes considerados a etiologia principal das patologias pulpares e periapicais (LEONARDO, 2005; CINTRA, 2008).

Mesmo sabendo que o preparo biomecânico reduz significativamente o número de bactérias do sistema de canais radiculares, há situações em que se exige a aplicação de uma medicação intracanal na tentativa de não haver possibilidade de persistência de micro-organismos na complexa anatomia do sistema de canal radicular. A medicação intracanal ideal deve ser composta de diversas propriedades como eliminar micro-organismos que sobreviveram ao preparo químico-mecânico, impedir a proliferação destes sobreviventes, fazer o papel de barreira física para não acontecer reinfecção ou infecção proveniente de micro-organismos da saliva, reduzir a sintomatologia e inflamação perirradicular, controlar exsudação persistente, solubilizar matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar

reabsorção dentária inflamatória externa, estimular a reparação por tecido mineralizado. Por conseguinte, não existe atualmente um único medicamento com todas essas propriedades (SIQUEIRA-JR et al., 2010).

Antigamente denominados curativos de demora, as medicações intracanal podem ser classificadas em derivados fenólicos (eugenol), aldeídos (formaldeído), halógenos (hipoclorito, iodofórmio, clorexidina), bases (hidróxido de cálcio), corticosteróides (dexametasona, prednisolona), antibióticos (rifampicina, neomicina), muitas vezes sendo utilizadas associadas a fim de buscar as propriedades descritas (SIQUEIRA-JR et al., 2010). Apesar de existir relatos sobre o sucesso nas técnicas endodônticas (IMURA et al., 2007), ainda há dificuldade em debelar os micro-organismos resistentes na infecção do sistema de canais radiculares já que essas medicações intracanal utilizadas atualmente são incapazes de o fazer, principalmente quando se trata de *E. faecalis* (VIANNA et al., 2005; GOMES et al., 2009a; QUEIROZ et al., 2009; ATHANASSIADIS et al., 2010; JHAMB et al., 2010; SIQUEIRA-JR et al., 2010).

O uso do Hidróxido de Cálcio como medicação intracanal seria uma alternativa interessante por ocasionar a dissociação iônica de íons Cálcio e íons Hidroxila, o que explica sua ação tecidual biológica e antimicrobiana, neutralizando endotoxinas, agindo como indutor de reparo por tecido mineralizado, além de atividade antiinflamatória. Seu pH extremamente alcalino desnatura proteínas auxiliando na atividade das soluções irrigadoras e inibe também a atividade de enzimas que provocam a reabsorção radicular. Pelo fato de ser caracteristicamente um pó branco, é necessário usar um veículo para sua inserção nos canais radiculares. As pastas que ele compõe proporcionam preenchimento do canal radicular com propriedades físico-químicas e biológicas apropriadas para uma medicação temporária, no entanto todas essas qualidades somadas são insuficientes para erradicar *E. faecalis* (QUEIROZ et al., 2009; SIQUEIRA-JR et al., 2010).

O óxido de zinco tem sido utilizado com frequência para compor a medicação intracanal de pastas endodônticas. Sua adição tinha inicialmente a intenção de melhorar a radiopacidade dessas pastas e também diminuir a solubilidade do hidróxido de cálcio (QUEIROZ et al., 2009; ATHANASSIADISS et al., 2010). No entanto, é possível observar efeito adicional antimicrobiano de pastas endodônticas que têm óxido de zinco em sua composição (QUEIROZ et al., 2009). Sunzel et al. (1990) observaram *in vivo* o efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* de óxido de zinco implantado no subcutâneo de porcos e coelhos sem prejudicar a função de PMNs. Cremes dermatológicos são utilizados na medicina como antisséptico para tratamento de eczema, impetigo, úlceras varicosas, pruridos, psoríase o que justificaria sua atividade antimicrobiana incremental. Sua pouca solubilidade em água pode inibir o crescimento de fungos em pinturas, fato interessante, pois é conhecida a presença de fungos também no biofilme endodôntico. O zinco puro foi isolado inicialmente a partir da calamina (silicato básico de zinco) reduzida por carvão mineral, entretanto a zincita é o mineral que já tem óxido de zinco em sua composição (SAVIOLI, 1992). Sua atividade contra *E. faecalis* ainda não está clara visto que existem estudos que mostram pouca ou nenhuma atividade (LEONARDO et al., 2000; ATHANASSIADIS et al., 2010) e outros que provam o contrário (QUEIROZ et al., 2009).

A possibilidade de associar as propriedades dessas substâncias ocorre com o emprego de um veículo compondo as pastas endodônticas para medicação intracanal. Os veículos poderão ser inertes ou possuir características químicas auxiliares ao Tratamento Endodôntico. As características físico-químicas dos veículos vão determinar sua indicação clínica. Existem aqueles que são hidrossolúveis aquosos como a água destilada, soro fisiológico, solução anestésica estéril; estes possuem rápida dissociação de seus componentes e promovem um efeito quase imediato. Como exemplos de veículos hidrossolúveis viscosos existem o propilenoglicol, polietilenoglicol e a glicerina que promovem ação em médio prazo. Também

existem veículos oleosos como a oliva que possui ação mais tardia (ESTRELA et al., 1999; SIQUEIRA-JR et al., 2010).

Tanto o Propileno glicol, como o Polietileno glicol 400 são veículos inertes que não têm interferência na atividade antimicrobiana, no entanto auxiliam nas características químicas das pastas: dissociação, difusão e capacidade de preenchimento dos canais radiculares. O uso de um veículo em sua substituição, que proporcionasse uma melhora na atividade dos outros componentes da medicação intracanal, seria interessante. Este potencial adicional poderia auxiliar na sanificação do sistema radicular que é um desafio ainda não alcançado, principalmente nos casos de micro-organismo resistente aos fármacos atualmente usados, os quais não têm tido sucesso para infecções persistentes (ESTRELA et al., 1999; EVANS et al., 2002; STUART et al., 2006; MATHEW et al., 2010; SIQUEIRA-JR et al., 2010; MA et al., 2011).

O uso de clorexidina pode ser um exemplo interessante que está sendo empregado como protocolo para ajudar a debelar o biofilme que se forma inclusive na superfície externa de raízes de canais já obturados. Sua ação antisséptica é capaz de ser eficiente na eliminação de bactérias resistentes (GOMES et al., 2009b; DELGADO et al., 2010). Este composto halogenado foi incluído neste estudo como controle positivo. A substantividade da clorexidina e a presença de cloro em sua molécula é determinante para sua atividade antimicrobiana. A clorexidina tem sido aplicada na Endodontia como medicação intracanal ou substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico com apresentação na forma de gel associada ao Natrosol, que é inerte. Na Odontologia possui aplicações em diferentes soluções aquosas desde 0,12% até 2%, sendo nossa referência a concentração de 2% em gel, utilizada no tratamento endodôntico. É uma substância incolor e inodora, com maior eficiência antimicrobiana na faixa de pH de 5,5 a 7 (CINTRA, 2008; GOMES et al., 2009a; VIANNA; GOMES, 2009).

Em razão da dificuldade encontrada para debelar o *E. faecalis* existem técnicas alternativas sendo empregadas na tentativa de aumentar o sucesso do tratamento endodôntico, nestes casos. Dentre elas pode-se citar a terapia fotodinâmica (AMARAL et al., 2010), terapia com ozônio (GUINESI et al., 2011) e a fitoterapia. Estudos visando novas soluções em tratamentos com produtos de origem natural estão presentes na literatura, sendo relativamente recentes na área da Endodontia. A biocompatibilidade do óleo essencial e da resina de *Copaifera multijuga* foi testada em conjunto com o hidróxido de cálcio estudando também sua análise fotoquímica (BANDEIRA, 1998; BANDEIRA et al., 1999a; BANDEIRA et al., 1999b; BANDEIRA, 2000) e sua atividade antimicrobiana (GARRIDO et al., 2004; ABNADER, 2005). Sua composição em um cimento endodôntico foi também avaliada quanto às suas características físico-químicas e biológicas (GARRIDO et al, 2010).

Novas substâncias, a exemplo dos produtos da copaíba, vêm sendo avaliadas para uso no tratamento endodôntico. O poder antimicrobiano do extrato proveniente da espécie *Stryphnodendron barbatimam* (Barbatimão), em comparação com as concentrações de 1% e 2,5% de hipoclorito de sódio, comprovou ter eficácia similar sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, mas não sobre a cepa de *Escherichia coli* (SPONCHIADO-JR et al., 2005). Outro exemplo de atividade antimicrobiana em canais radiculares infectados pode ser citado, o extrato de *Arctium lappa*, cujo nome mais comum é Bardana (PERIN et al., 2001; PEREIRA, 2004; GENTIL et al., 2006). Especificamente contra o *Enterococcus faecalis* foi testado *in vitro* um medicamento intracanal de origem vegetal *Pothomorphe umbellata* (SPONCHIADO-JR, 2006), assim como o alcaçuz foi testado associado ao hidróxido de cálcio (BADR et al., 2010) e também a própolis (KAYAOGLU et al., 2011).

A *Musa paradisiaca*, a popular banana, tem várias aplicações pouco conhecidas pela sociedade. Seu uso tem sido há muito tempo frequentemente voltado para compor uma dieta

saudável (EDDY; KELLOGG, 1927), no entanto é fato que pode ter importantes aplicações terapêuticas (COE; ANDERSON, 1999; GROVER et al., 2002; KALA, 2005; NETO et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; GOMES, 2008; COELHO-FERREIRA, 2009). Baseado em medicina popular, a banana tem sido alvo de novas pesquisas para validar cientificamente suas propriedades curativas e antimicrobianas (BRAGA, 1949; JONES, 1965; YANG et al., 2000; MONDAL et al., 2001; JANG et al., 2002; JESUS et al., 2004; OKUDA, 2005; OLIVEIRA, 2005; GIORGETTI et al., 2007; VIJAYAKUMAR et al., 2008; DESHMUKH et al., 2009; MARTINS et al., 2009; BENNETT et al., 2010; SWANSON et al., 2010; OHLA et al., 2011) podendo ter importante papel como biomaterial inovador.

A *Musa paradisiaca* é mundialmente consumida em larga escala e o seu cultivo é feito principalmente em regiões de clima tropical, portanto é de fácil aquisição. Em algumas comunidades, a banana é utilizada com propriedades curativas, com poder de cicatrização de úlceras epidermais e gástricas, para reduzir a hiperglicemia, com efeito antimicrobiano (GOEL et al., 1989; SHARMA et al., 1989; LEWIS et al., 1999; PARI; UMA-MAHESWARI, 1999; GROVER et al., 2002). O conhecimento etnobotânico regional provém de membros dessas comunidades que, ainda hoje, utilizam plantas no tratamento de sintomas e cura de doenças que afetam sua população, dentre elas a doença cárie (COE; ANDERSON, 1999; GROVER et al., 2002; MEDEIROS et al., 2004; KALA, 2005; NETO et al., 2006; MACIEL; GUARIM-NETO, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; FALCONI-FILHO, 2008; GOMES, 2008; COELHO-FERREIRA, 2009).

Há uma escassez de estudos de *Musa paradisiaca* na Odontologia. Foram encontradas citações de estudos na Indonésia que relatam o efeito cicatrizante da seiva da banana melhorando o reparo de feridas cirúrgicas de exodontias. Um deles avaliou a citotoxicidade da seiva considerando-a biocompatível, com sobrevivência em média de 60% dos fibroblastos (WINDA, 2011). Avaliar as propriedades antimicrobianas frente à cepa comumente

encontrada em infecções refratárias endodônticas, tal como o *Enterococcus faecalis* (NAIR, 1990; SIQUEIRA-JR, 2001; SPONCHIADO-JUNIOR, 2006; BRAGA, 2007; COSTA et al., 2008; HOCKETT et al., 2008; KISHEN et al., 2008; ARIAS-MOLIZ et al., 2009), caracteriza um importante passo para comprovar as propriedades do extrato glicólico de banana com perspectiva de futura aplicação na Endodontia.

Baseado no exposto, o presente trabalho visa avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* sobre o principal micro-organismo presente em infecções refratárias endodônticas, comparando-as àquelas pastas alcalinas rotineiramente usadas como medicação intracanal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Com vistas ao embasamento científico deste estudo, procurou-se fazer um levantamento cronológico da literatura que pudesse elucidar o comportamento biológico terapêutico dos constituintes de *Musa paradisiaca*, bem como apresentar suas características botânicas e seu uso medicinal em diversas comunidades. Da mesma forma, a medicação intracanal teve apresentada representativamente sua evolução cronológica e por fim a microbiologia do biofilme patogênico de infecções endodônticas ressaltando a importância do *Enterococcus faecalis* nas mesmas, relacionando sua resistência ao Tratamento Endodôntico.

2.1 A Etnobotânica e a *Musa paradisiaca*: de Planta Medicinal a Fitoterápico

Eddy e Kellogg (1927) apontaram a banana como importante na dieta alimentar. Fizeram o experimento em filhotes de porcos pesando inicialmente 350g, em que diferentes grupos foram alimentados com banana madura, verde ou cozida. Era dado 5g de banana por dia e foi verificado um aumento diário de 7g a 10g do peso dos porcos. A presença de vitamina C era maior em frutos verdes do que nos maduros, considerada também excelente fonte de vitamina A, boa fonte de vitamina B, raros traços de vitamina E e deficiente em vitamina D. Avaliando a composição de frutos de banana comestíveis encontraram: 75,3% de água, 22% de carboidratos, 19,9% açúcares, 0,6% de gorduras, 1,3% proteínas, 0,8% celulose, 0,9% de cinza, 0,009% de cálcio, 0,028% de magnésio, 0,401% de potássio, 0,034% de sódio, 0,031% de fósforo, 0,125% de cloro, 0,01% de enxofre, 0,0006% de ferro. Relataram que o amido sofreria hidrólise resultando em sucrose, glucose e frutose, conforme ocorre o amadurecimento da fruta. A polpa da banana verde é composta de um conjunto de moléculas de celulose enfileiradas e lado a lado com a pectose são empacotados por seiva e grânulos de amido. O amadurecimento transforma a pectose em pectina que é solúvel em água, liberando-

as. A dificuldade em isolar as proteínas foi mencionada e também a presença de um fenômeno de ligação entre os taninos e “um tipo de gel” que seria responsável pela perda do sabor adstringente da banana verde. A banana é um bom suplemento alimentar para uma dieta saudável.

Braga (1949), em um levantamento botânico das “Plantas do Ceará”, catalogou a *Musa paradisiaca*. As matrizes selvagens das bananeiras cultivadas parecem localizar-se na Ásia, desde as Índias às Filipinas – incluindo a Malásia. O fruto comestível não era conhecido na América pré-colombiana, foram trazidas da África e da Ásia no início da colonização, entretanto Gabriel Soares em seu “Tratado Descritivo do Brasil”, no ano de 1587, cita a “pacoba” como natural da terra, sendo conhecido naquela época como “banana” apenas variedades exóticas originárias de São Tomé. No Amazonas, “pacova” são consideradas as bananas da terra, enquanto que nas Guianas conhece-se a variante “bacove”, remetendo ao termo tupi “pac-oba” cujo significado seria “folha de enrolar” ou “que se enrola” ligado às bananeiras ou Musáceas. Enquanto os portugueses as apelidavam de “figos”, referindo-se às variedades comestíveis, da Guiné e arredores veio a origem do nome “banana” generalizada para “todas as castas desta preciosa fruta”, conforme Jacques Raimundo no ano de 1933 em seu livro: “O Elemento Afro-Negro na Língua Portuguesa”. A bananeira é da família das Musáceas, com muitas espécies, mas três principais de cultivo no Brasil: *Musa Cavendishii* (cultivares: banana baé, nanica, caturra, banana d’água, anã), *Musa paradisiaca* (cultivares: banana da terra, comprida, chifre de boi, pacova), *Musa sapientum* (cultivares: banana prata, banana maçã, banana curuda, banana São Tomé, banana roxa, banana piroá). A composição química da polpa do fruto maduro da Banana da Terra teria os teores médios de 66,8% água, 1,6% de proteínas, 0,2 % de matérias graxas, 29,9% de açúcar e amido, 0,9% de celulose, 1,1 de cinza. Destaca-se a banana em comparação a outros alimentos cultiváveis no valor energético obtido por acre cultivado com 8.320.000 cal, bem como a sua produção 32.000

libras por acre. Sua importância comercial é grande tendo em vista o grande potencial de energia alimentar e a resistência ao transporte com baixo preço, universalizando-se o consumo da banana. A seguir descreve-se a espécie de *Musa paradisiaca* (Figura 1):

O pseudocaule mede 2,50 - 3,50 m de comprimento, esverdeado, com manchas escuras na base do pecíolo, tendo este os bordos virados. Folhas de 1,70 - 2,00 m de comprimento por 65 - 72 cm de largura. Regimes pequenos, contendo 4 - 7 verticilos, com 20 - 35 frutos, pesando de 7 - 14 quilogramas. Ráquis muito comprido, sem restos florais. Fruto de 20 - 30 cm de comprimento, 5 - 6 cm de diâmetro, pesando 250 - 400 g, tri ou tetraquinado, um pouco arqueado, de casca grossa, amarela quando maduro, sendo a polpa de cor róseo salmão, dura, pouco açucarada, mas de gosto agradável. (idem, ibidem, p. 150-1).



Figura 1. Bananeira; o rizoma é capaz de lançar rebentos que formam novos pseudocaulos, agrupando-se em moitas.

Fonte: Parchen <<http://www.flickr.com/photos/parchen/3573751999/sizes/o/in/photostream/>>. Acesso em: 2 maio 2011.

Jones (1965) solucionou a interferência de taninos presentes na banana na extração de proteínas do látex. Os taninos têm forte interação com cadeias peptídicas formando complexos insolúveis em água e precisam ser separados quimicamente para isolar as proteínas

enzimáticas de interesse. Gelatinas, proteínas inertes e, também, a polivinilpirolidona fariam esse papel de precipitar complexos solúveis em água com baixo peso molecular de polifenóis (taninos), no entanto poderiam ter impedimento de oxidação posterior levando à desativação enzimática. O látex colhido foi de bananas verdes (Figura 2) do cultivar “Valery”, fracionado em centrifugação de baixa velocidade. A partição aquosa (pH 4,5) foi submetida à diálise, cromatografia por papel, teste de precipitação de taninos e análise colorimétrica. Após diálise prolongada, trocando a água destilada muitas vezes, o tanino permaneceu insolúvel em água. O polietileno glicol reagiu espontaneamente com o tanino do látex da banana, diferente de outros solventes orgânicos e água fervente nos quais era insolúvel. A cromatografia evidenciou que depois de o tanino ser tratado com o PEG o mesmo não se apresentava mais presente na partição. A estequiometria da reação entre o PEG-tanino ainda estava indeterminada, com provável ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia do PEG com grupamento hidroxila fenólico (tanino). Dopamina, serotonina e um flavonol não identificado foram revelados também. O uso de PEG na extração enzimática de plantas que contêm taninos mostrou-se eficaz.



Figura 2. Parâmetros utilizados para a determinação da maturação do fruto da banana.

Fonte: CEAGESP (2004).

Vega et al. (1988) procuraram determinar uma maneira de reutilizar resíduos de banana por fermentação de leveduras. Obtiveram fruto maduro da banana (Figura 2) e prepararam um suco: primeiramente lavaram, fatiaram e colocaram no vapor para branqueamento; removeram a casca, moeram a polpa, deixando esfriar à temperatura ambiente, ajustou-se o pH para 4,0 com 3 N HCl, incubando com 0,05% de pectinase proveniente de *Aspergillus niger* por 2 h sob agitação em banho-maria a 25°C; o suco foi separado do resíduo em centrífuga 27000 X g por 20 min a 4°C; por fim foi filtrado em papel filtro nº 40 Whatman e armazenado a -29 °C. Para sua utilização ele era diluído a 20% em água destilada e acertado o pH para 5,2, para depois ser esterilizado. O suco extraído era claro e amarelado e com aproveitamento de 82% depois de incubado com a pectinase, com viscosidade absoluta de 3,72 P. Depois de esterilizado se tornava mais escuro e embaçado com formação de precipitado, sendo possível a formação ou degradação de componentes depois do aquecimento. Apresentava 24,4% de açúcares totais, 5,2% de glucose, 3,9% de frutose e 15,3% de sucrose, sendo que houve um aumento de 15% de açúcares totais depois da esterilização. O suco também continha 0,62% de lipídios, 0,77% de cinza e 0,087% de nitrogênio. O amido não foi detectado no suco, mas apenas na polpa por meio da adição de iodo, uma das duas metodologias empregadas para tal fim. Para conseguir sucesso na fermentação era necessário adicionar mais nutrientes, sempre respeitando a concentração de 20% do suco. Nessas condições foi possível produzir índices elevados de biomassa, mas a produção de lipídios não foi possível necessitando outros estudos para aprimorar a técnica.

Sharma et al. (1989) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do rizoma de *Musa paradisiaca* H. Kela. Relataram que seu fruto é consumido em larga escala pela população da Índia e que existe uso do rizoma para fins anti-helmínticos e anticoncepcionais. Os rizomas, depois de processo de secagem, foram submetidos sequencialmente à extração com hexano, benzeno e etanol para depois serem concentrados no rotaevaporador. A atividade

antimicrobiana foi feita pelo teste de difusão em ágar com discos de filtro de papel, utilizando os meios de cultura em caldo Sabouraud e caldo Oxoid, para atividade antifúngica e antibacteriana. O crescimento das culturas de bactérias foi durante 18h a 37°C e para os fungos 72h a 26 °C. Todos os testes foram feitos em triplicata e medidos os halos dos diâmetros de inibição. Os controles positivos foram penicilina para bactérias e hamycin para fungos. Os micro-organismos testados foram: *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Streptococcus β-haemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. pyocyance*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*. O extrato benzênico teve a maior atividade antimicrobiana, exceto para *P. pyocyance*. O extrato hexânico teve boa atividade contra bactérias Gram-negativas em comparação às Gram-positivas e aos fungos. O extrato etanólico apresentou boa atividade apenas contra *Streptococcus β-haemolyticus* e *Klebsiella aerogenes* e nenhuma atividade foi observada contra os outros micro-organismos. Conclui-se que os diversos extratos possuem princípios ativos diferentes com efeito antimicrobiano a diferentes micro-organismos, devendo ser identificados quimicamente.

Orie (1997) verificou que o extrato aquoso de *Musa paradisiaca* teve efeito vasodilatador na aorta e veias de ratos. O extrato foi feito de frutas maduras foram descascadas e marteladas para solubilizar em água. A solução aquosa foi centrifugada e filtrada em papel Whatman. O filtrado foi evaporado e o resíduo foi utilizado para preparar o extrato em uma concentração de 10^{-6} para 1 mg/ml. Depois de sacrificados os ratos foram obtidos anéis da aorta e de veias para observar sua reação ao extrato, mantido o tecido oxigenado em solução normal salina. Em um sistema reproduzindo estímulos adrenérgicos foi avaliada a influência do extrato sob os tecidos dos vasos. Os resultados indicam que houve relaxamento inespecífico da musculatura e inibição do tônus muscular dos vasos sanguíneos avaliados, lembrando que esse efeito não pode ser atribuído à alta concentração de serotonina

presente no extrato, já que esta, quando testada isoladamente, produziu contração muscular, no entanto não se exclui a possibilidade de haver a interação *in vivo* da mesma, quando proveniente do extrato.

Alves (1999) e Moreira (1999) descreveram a *Musa paradisiaca*, herbácea naturalmente encontrada em regiões tropicais úmidas e subtropicais. Apresenta seu tronco sob o solo, denominado rizoma, de onde provêm as bainhas das folhas em conjunto, que emergem formando o pseudocaule, popularmente conhecido como o tronco da bananeira. Sua multiplicação acontece por meio do lance de novos rebentos por via vegetativa (Figura 1). As flores em cachos surgem do coração da bananeira (Figura 3). Curiosamente, os frutos são partenocárpicos e não desenvolvem sementes em seu interior, os pontos escuros correspondem a óvulos não desenvolvidos. Sua fase de gestação inicia-se com a formação de um broto-rebento em outra bananeira. Por esse motivo, sempre ao redor de uma bananeira adulta encontrar-se-ão outras bananeiras em diversos estágios do ciclo de vida, formando uma touceira.



Figura 3. Bananeira; coração surgindo do cacho de bananas.

Coe e Anderson (1999) observaram as plantas utilizadas pelos ameríndios do nordeste da Nicarágua. Escolheram os Ulwa, uma das três tribos remanescentes dos Sumu, que utilizam 187 espécies de plantas para tratamento de 25 tipos de doenças. A administração é normalmente realizada via oral por meio de decocção de folhas. Foi realizado um ensaio para o reconhecimento de moléculas consideradas bioativas nas plantas, levando-se em conta os alcalóides e os glicosídeos, sendo que 70% mostraram apresentar traços desses componentes, a maioria herbácea. Comparando-se com os Miskitu do sudoeste da Nicarágua, 90% das plantas eram as mesmas, levando-se em consideração que estes possuem um território maior e mais plantas exclusivas da região. Portanto as pequenas diferenças encontradas foram apenas de abrangência territorial sem envolver diferenças culturais. A *Musa paradisiaca* L. tem a sua seiva e seu fruto usados *in natura* ou como cataplasma para tratamento de picadas de cobra, diarreia e hemorragia. O teste molecular alcalóide/glicosídeo apresentou +L(FNg).

Lewis et al. (1999) extraíram ingrediente ativo antiulcerogênico do fruto verde de *Musa sapientum* L. Esse constituinte é polar, extraído com água morna ou álcool hidratado e se liga firmemente ao carvão vegetal ativo. Sua atividade antiulcerogênica é perdida quando aquecido acima de 50°C. Também conhecidos como leucoantocianidinas os compostos polifenólicos são flavan-3,4-diois e são o segundo composto mais polar da polpa da banana. Os frutos foram descascados e a polpa seca ao sol, para depois serem pulverizados. O fracionamento foi feito sequencialmente utilizando etanol, clorofórmio, acetona, clorofórmio e n-butanol. Utilizando-se o rota-evaporador os solventes foram removidos e a água foi removida por congelamento seco. Caracterizou-se do extrato aquoso por intermédio de cromatografia por papel, cromatografia por camada delgada, análise espectrofotométrica, cromatografia líquida de alta eficiência um flavonóide: leucocianidina. Induzindo úlceras gástricas em ratos foram administradas a banana verde seca pulverizada, a leucocianidina extraída do vegetal e a sintética que demonstraram efeito protetor da mucosa gástrica dos

animais, evidenciando a atividade antiulcerogênica dos flavonóides, que já tem sido citados na literatura como redutores da secreção de ácidos pelas células parietais do estômago.

Pari e Uma-Maheswari (1999) baseados em prática regional de uso do suco de flores de bananeira para tratar diabetes na Índia avaliaram a glicemia de ratos após administração de concentrações de extrato de flores de *Musa sapientum* L. Depois de coletadas 500g de flores usando para a extração 1,5 l de clorofórmio pelo método da extração quente continuada, foram obtidos 16,5 g de extrato, sendo este dissolvido em água estéril para ser usado no estudo. Os ratos foram induzidos a diabetes em duas semanas com glicemia de 200-260mg/100ml. Os 36 ratos foram divididos em 6 grupos, sendo um controle com ratos sem diabetes, o segundo com ratos diabéticos, diabéticos tratados com glibenclamida e o restante diabéticos tratados com o extrato em concentrações de 0,15, 0,20 e 0,25 g/Kg durante 30 dias. O extrato mostrou ser mais efetivo para reduzir a glicemia de ratos com diabete induzida do que a glibenclamida, resultando em reduções significativas da glicose sanguínea, hemoglobulina glicosilada e o aumento do número de hemoglobulinas, especialmente em referência a concentração de 0,25 g/Kg.

Ennos et al. (2000) examinaram anatômica e morfológicamente o pecíolo e a folha de *Musa textilis*, utilizando também uma abordagem mecânica quantitativa. As bananeiras são perenes com rebentos que emergem de rizomas ensoberbecidos substanciais. Os pecíolos se arranjam em espiral nos rebentos aéreos e suas bases sobrepostas formam um pseudocaulo robusto, através do centro do mesmo cresce a inflorescência terminal. Bem ao alto os pecíolos separam-se do pseudocaulo curvando-se para suportar as enormes folhas ovaladas em um ângulo oblíquo. O esquema estrutural do pecíolo é altamente eficiente, mesmo sem tecido composto por madeira e sendo muito leve, tem a capacidade de suportar as grandes folhas, resistindo a ventos fortes, inclusive a furacões, se curvando e voltando à posição anterior praticamente ileso. Sua armação oca e elementos de reforço longitudinais produzem uma

estrutura de baixa densidade e alta flexibilidade. Essa resistência flexural é aprimorada pelo formato em “U” observado no corte transversal do pecíolo (Figura 4), de modo que quando deformado para uma direção tende a reverter o movimento na direção oposta, tendo ainda a capacidade de ser muito complacente quando submetido à torção. Enquanto isso as estruturas internas orientadas como raios e as placas laterais de parênquima estrelado previnem achatamento dorsoventral, permitindo uma flexão ainda maior do pecíolo sem ser danificado, preservando sua estrutura e a do caule.

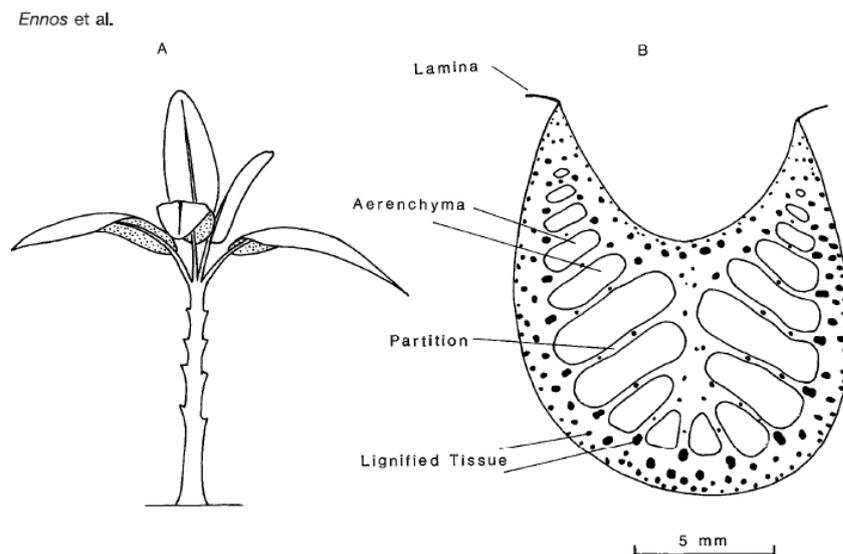


Figura 4. Diagrama da bananeira; (A) Vista geral da bananeira, observando que os pecíolos, que formam as regiões mais inferiores do pseudocaule se afastam no alto para suportar o peso das folhas. (B) Secção transversal do pseudocaule, mostrando seu formato em “U”, em uma estrutura aerada de eixos longitudinais.

Fonte: Ennos et al. (2000)

Yang et al. (2000) purificaram a enzima Polifenol oxidase de *Musa sapientum* L. O fato de existir dopamina na casca e polpa da banana e ela reagir fortemente com Polifenol oxidase, leva a crer que esta reação seria responsável pelo escurecimento da banana. O polissacarídeo da polpa da banana foi primeiramente hidrolisado por glucoamilase para não interferir nos procedimentos de purificação na troca iônica da cromatografia e na filtragem. A

molécula teve peso estimado de 41000. A enzima rapidamente oxidou a dopamina sendo o pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 30°C para esta reação. Sua atividade foi inibida por dietil-ditiocarbamato de sódio e cianeto de potássio, assim como pelo L-ácido ascórbico e cisteína. Entretanto, sob baixa capacidade tamponante, em pH 7, sua atividade também foi marcadamente inibida pelo ácido cítrico e ácido acético, podendo estes ser compostos capazes de evitar o escurecimento da banana.

Mondal et al. (2001) avaliaram a composição química do gel de *Musa paradisiaca* na Índia. O gel é produzido em resposta a lesões físicas ou ataque de patógenos. A bananeira, conhecida por seu rico valor alimentício, apresenta efeitos terapêuticos no tratamento de disenteria, diarreia e cura nas lesões intestinais de colite usada na medicina popular indiana. O gel foi coletado durante o mês de novembro de plantas locais. 100g do exsudato mucilaginoso foi extraído com 2 l de água depois de concentrado no rotaevaporador, então foi diluído em 6 l de etanol produzindo um precipitado branco. O material peletizado foi redissolvido em água e foi adicionado etanol absoluto lentamente à temperatura ambiente até a solução atingir uma concentração de 75%. Os componentes solúveis em água foram divididos em 4 frações por cromatografia de troca iônica. Polímeros fracionados continham arabinose, xilose e ácido galacturônico como a maioria dos açúcares presentes e, ainda traços de resíduos de galactose, ramnose, manose e glucose. Análise por metilação e oxidação por periodato confirmaram a presença de molécula bastante ramificada arabinoxilano com moléculas terminais de arabinopiranosil e arabinogalactano tipo I pectina.

Grover et al. (2002) revisaram o uso de 45 plantas medicinais indianas contra diabetes. *Musa sapientum* foi citada utilizando a administração 4 ml/Kg da decocção das flores em coelhos hiperglicêmicos com bons resultados diminuindo os picos e a área da curva de tolerância da glicose. Ainda foram citadas atividade antioxidante e hipolipidêmica da banana. Os autores ressaltam a importância de uso dos conhecimentos da medicina tradicional em

países ainda em desenvolvimento como uma alternativa econômica viável, além de promover o advento de novos biomateriais com significativa atividade contra patógenos endêmicos.

Jang et al. (2002) verificaram o potencial químico preventivo de câncer de constituintes de *Musa paradisiaca*. No gênero *Musa* foram isolados em estudos fitoquímicos anteriores fenilfenalanonas, triterpenos, flavonóides, esteróides e antocianina. Na fração de acetato de etila do extrato metanólico de banana, induziu-se significativamente a enzima quinona redutase em células cultivadas de hepatoma em ratos. Essa enzima é responsável pela desintoxicação metabólica de carcinógenos químicos e oxidantes nocivos, tornando-se importante no mecanismo de proteção contra o início de formação de tumores. Foi isolado um novo diaril-heptanóide bicíclico: rel-(3S,4aR,10bR)-8-hidroxi-3-(4-hydroxyphenil)-9-methoxy-4a,5,6,-10b-tetrahydro-3H-nafto[2,1-b]pirano. Outros quatro constituintes já conhecidos foram isolados: 1,2-dihidro-1,2,3-trihidroxi-9-(4-methoxyphenil)fenalano; hidroxianigorufona; 2-(4-hidroxi-phenil)anidro naftálico; 1,7-bis(4-hidroxi-phenil)hepta-4(E),6(E)-dien-3-ona. O novo composto encontrado teve sua estrutura e estereoquímica elucidada por RMN mono e bidimensional e análise cristalográfica por difração de raios-X. A atividade enzimática de quinona redutase foi induzida *in vitro* e a biocompatibilidade *in vitro* avaliada por meio de cultura de células mamárias de ratos. 2-(4-hidroxi-phenil)anidro naftálico foi citotóxico neste estudo, entretanto todos os outros compostos também induziram a atividade enzimática, sendo que o de maior potência foi 1,7-bis(4-hidroxi-phenil)hepta-4(E),6(E)-dien-3-ona.

Jesus et al. (2004) avaliaram a composição físico-química de dez genótipos de bananeira e, dentre outros resultados, encontraram nos frutos maduros: teor residual de amido entre 0,9% e 7,1%; teor médio de açúcares totais entre 18,8% e 24,9%; teor de açúcares redutores, 17,3% e 23,6%; teor de ácido ascórbico, 5,2 mg.100g⁻¹ e 11,95 mg.100g⁻¹; valores de acidez total titulável entre 0,25% e 0,54%.

Medeiros et al. (2004) realizaram levantamento de 36 espécies de plantas medicinais da reserva do Rio das Pedras, estado do Rio de Janeiro, um remanescente da Floresta Ombrófila Densa, utilizadas pelos sítiantes residentes no local e de ascendência dos meeiros que trabalhavam nas plantações de banana da antiga fazenda “Goiabal”. Estas espécies puderam ser relacionadas a 28 usos medicinais, organizadas em 7 grupos. Havia 21 espécies de plantas herbáceas, 8 arbustivas, 5 arbóreas. Por meio de entrevistas estruturadas e semi-estruturadas aplicadas a essa comunidade foi feito o levantamento dessas espécies ao redor das casas dos mesmos. A folha era a parte mais utilizada e a manipulação mais comum era o decocto, sendo na área as de maior utilização a erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a pitanga (*Eugenia uniflora* L.). A banana (*Musa sapientum* L.) estava entre as espécies mais citadas sendo utilizada a folha deste herbáceo *in natura* para cicatrização. Deste modo, os autores elucidaram as espécies utilizadas com fins medicinais em áreas ainda habitadas da Floresta Atlântica.

Borges (2005) avaliaram em ensaios *in vitro* e *in vivo* o efeito inibitório da seiva de *Musa paradisiaca* L. contra o veneno de cobra. A coleta foi feita diretamente do pseudocaule da bananeira por meio de punção, centrifugado por 5 min a 3000 X g e o sobrenadante filtrado em papel Whatman, liofilizado e estocado a -20°C. O veneno de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi* e *Crotalus durissus terrificus* liofilizado foi dissolvido em soro fisiológico e centrifugado por 5 min a 3000 X g, em seguida os sobrenadantes foram imediatamente colhidos e utilizados no estudo. O extrato de *Musa paradisiaca*, quando misturado ao veneno de *crotalidae*, inativou sua proteína, demonstrou efeito anti-hemorrágico e anulou seu efeito letal *in vitro*. Quando administrados separadamente em vias diferentes *in vivo* em ratos não surtiu efeito. A presença de polifenóis e taninos no extrato pode ser responsável pela desnaturação de proteínas presentes no veneno. O perfil da eletroforese tanto do plasma sanguíneo quanto do veneno foi alterado quando adicionado o extrato da seiva de bananeira.

Os compostos formados poderiam ter dimensões moleculares que não permitiram entrar no gel. Os componentes do extrato reagem com proteínas plasmáticas e por isso não houve sucesso quando utilizado *in vivo*, pois não poderiam reagir com as proteínas do veneno presentes no organismo do roedor.

Kala (2005) estudou o conhecimento etnobotânico da tribo Apatani da região nordeste da Índia. Região conhecida por sua grande biodiversidade, possui muitas outras comunidades a serem avaliadas quanto ao uso medicinal de plantas. 158 espécies com esse fim são utilizadas pelos membros da tribo Apatani para cura de 52 tipos de doenças. 19 espécies eram do gênero *Asteraceae* sendo a mais predominante, seguida por *Zingiberaceae*, *Lamiaceae*, *Araceae*. As partes mais usadas dos vegetais eram as folhas (56 espécies) e depois o fruto. O fruto de *Musa paradisiaca* L. é utilizado para indigestão pelos membros da tribo.

Okuda (2005) em uma revisão de literatura verificou que a presença de taninos em plantas medicinais tem demonstrado a atividade biológica dessa molécula pode contribuir com os efeitos benéficos que as mesmas apresentam sem apresentar toxicidade. Avaliando-se o isolamento e determinação da estrutura molecular de centenas destes elagicotaninos e dehidroelagicotaninos, como também seus oligômeros e derivados oxidados classificou-se esses derivados fenólicos de acordo com o estado de transformação oxidativa de suas estruturas e oligomerização, verificando-se a existência de paralelos entre a evolução da planta e o estado oxidativo. Além das atividades redutoras e de anti-peroxidação, verificou-se a atividade antitumoral, antiviral e o potencial antibacteriano dessas moléculas.

Neto et al. (2006) participaram do projeto CALÚ implementando atividades sócio-educativas e culturais em Itamatatua e Samucangaua, comunidades remanescentes quilombolas no Maranhão, visando o desenvolvimento sustentável das mesmas. Dessa maneira procurou-se atingir algumas metas, dentre elas: identificar a referência em saúde para as comunidades; verificar o conhecimento das comunidades sobre saúde integral e fatores que

interferem na mesma, bem como a conduta adotada quando adoecem; coletar dados dos registros das famílias de Itamatatiua de posse das Agentes Comunitárias de Saúde; introduzir noções de higiene pessoal e dos alimentos e educação alimentar; conhecer da comunidade de Itamatatiua sobre o uso de plantas com fins terapêuticos, listando-as de acordo com a finalidade a que se destinam e fotografando-as; recuperar conhecimentos populares sobre a produção de medicamentos com plantas, esclarecendo sobre os riscos da automedicação e introduzindo noções de cuidados e preparo dos remédios caseiros bem como suas indicações e contra-indicações com base em estudos científicos. Foram coletados dados de registro das agentes comunitárias somando 123 famílias no local, com 141 crianças, 80 adolescentes, 225 adultos, 52 idosos e 5 de faixa etária desconhecida. Das 120 casas 35% não possuem energia elétrica, 50% não fazem nenhum tratamento da água, não existe coleta de lixo. Dentre as 52 plantas medicinais listadas, a bananeira foi citada para dor de dente (cárie) utilizando o leite de banana para esse fim. Verificou-se que a maior parte dos problemas de saúde da população decorre da falta de saneamento básico, infra-estrutura domiciliar e ambiental e informações acerca da boa higiene e de prevenção de doenças.

Albuquerque et al. (2007) fizeram o levantamento de 21 trabalhos científicos publicados de pesquisas etnobotânicas sobre plantas medicinais da Caatinga, abrangendo os estados brasileiros de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco e Sergipe no período de 1985 e 2006. Coletaram desses artigos os nomes científicos, nomes populares, partes utilizadas da planta quando citadas, indicação terapêutica. Dessa maneira caracterizaram o um índice de importância relativa dependendo do número de vezes que a espécie foi levada em conta por esses trabalhos. Houve um levantamento de 389 espécies de planta, dentre as quais apenas 48 tiveram um índice de importância maior do que 1,0, sendo que apenas 9 dessas espécies eram endêmicas da Caatinga. A bananeira também foi citada como planta medicinal utilizada para tosse, bronquite, asma, gripe, inflamações em geral, diarreia e antiofídica e relataram o uso da

raiz e das folhas para tais fins, com índice de importância com valor de 0,7. A análise dos autores verificou grande número de espécies de plantas medicinais conhecidas da Caatinga, região Nordeste do Brasil, com necessidade de futuros experimentos fitoquímicos e farmacológicos e também de uma visão mais detalhada de sua disponibilidade para uso da população em geral.

Giorgetti et al. (2007) fizeram um levantamento histórico de registros literários no Brasil que apontassem plantas medicinais aplicadas para doenças do sistema nervoso central consultando fontes desde o século XVI. Levando em consideração a ampla biodiversidade presente na Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal, como também a agregação de conhecimentos multiculturais provenientes da colonização por povos da África, Ásia, Europa com os povos nativos, o conhecimento etnobotânico se enriqueceu muito. Foi feita uma triagem de livros que apresentassem tratamentos com plantas medicinais para doenças do sistema nervoso central nas bibliotecas da Universidade de São Paulo, Museu Padre Anchieta, Instituto Botânico de São Paulo e coleções privadas de dois pesquisadores com mais de 40 anos de experiência no uso de plantas medicinais, sendo que 6 livros foram selecionados. A partir daí foram consultados pelos nomes científicos os sítios eletrônicos da “Pubmed”, os Anais de 1968 a 2004 do Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais e a base de dados fitoquímica e etnobotânica “Dr Duke”. Além disso, foi verificado no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária o registro das plantas medicinais, bem como a presença de patente nos órgãos regulatórios brasileiro, americano e europeu. Para *Musa sapientum* L. houve 1 relato na literatura histórica do uso do fruto como inebriante e intoxicante em 1939; ainda foram encontrados 7 estudos fitoquímicos evidenciando a presença de óleos essenciais, flavonóides, triterpeno cicloartanos, taninos e esteróides; 3 estudos farmacológicos mostrando efeito antioxidante e para sanar paralisia muscular; 1 patente com uso farmacológico antidepressivo.

Oliveira (2007) avaliou a capacidade de absorção de estigmasferol de *Musa paradisiaca* L. com diferentes tipos de microencapsulamento para uso terapêutico. O estigmasterol é uma substância esteroideal de origem vegetal, presente na bananeira, com propriedades farmacológicas hipocolesterolêmica, antiinflamatória, antinociceptiva e preventiva de cânceres mamário e prostático ainda pouco exploradas. O organismo tem dificuldade em absorvê-lo pela sua fácil oxidação. O microencapsulamento tem a finalidade de promover a melhor absorção e tornar a molécula biologicamente ativa, sem ser degradada antes de atingir sua atividade fim. Sua extração foi realizada a partir de 10,43kg de cascas secas e estabilizadas de frutos maduros de *Musa paradisiaca* L., utilizando etanol e em seguida hexano. O extrato hexânico foi submetido a tratamento de partição sólido-líquido com sílica gel G com a sequência de solventes hexano, diclorometano e clorofórmio; seguido de cristalizações com éter de petróleo, acetona e n-pentanol para obter o estigmasterol em grau de pureza de 90,1% com rendimento de 0,05% em relação à massa de vegetal seco. O microencapsulamento foi realizado por moléculas protéicas de gelatina, moléculas lipídicas de ácido esteárico e os tensoativos fosfatidilcolina de soja e monooleato de sorbitano etoxilado por método de polimerização de microemulsão. Os resultados indicam que o revestimento lipídico favorece as propriedades absorptivas do fármaco, enquanto o revestimento protéico promove maior estabilidade ao estigmasterol.

Gomes (2008) em uma revisão da literatura procurou elucidar os fitoterápicos utilizados em Odontologia para tratamento das diversas patologias bucais. Dentre as 150 plantas medicinais encontradas, 60 tiveram comprovação científica de sua atividade terapêutica. Com relação à *Musa paradisiaca* L., encontrou que a seiva é adstringente e possui ação anti-hemorrágica indicada para aftas. A casca da banana com uso tópico tem ação cicatrizante, evitando a formação de edemas e também anti-hemorrágica. No caso de

odontalgia o sumo do talo do cacho da bananeira é utilizado. A decocção produz um extrato que é indicado fazer bochecho para tratamento de gengivite.

Park et al. (2008) estudaram a casca da banana, um resíduo agrícola desperdiçado, usada para reduzir o Cr(VI) a Cr(III) diminuindo consideravelmente a toxicidade desse detrito industrial. A incorporação de alginato de cálcio solucionou a eliminação de Cr(III) que não era suficientemente realizada pela casca da banana. A reação que supostamente acontece em solução aquosa tem relação com a provável composição das moléculas da casca da banana carregadas positivamente que se ligam ao Cr(VI) aniônico, podendo ser grupamentos fenólicos, tanino, lignina, tiol que são relatados como doadores de elétrons em biomateriais. Esse novo biossorvente de Cr(VI) é 4 vezes mais eficaz do que redutores químicos e apresenta-se como uma solução ecológica e economicamente viável.

Vijayakumar et al. (2008) examinaram o efeito antioxidante da presença de flavonóides de *Musa paradisiaca* na dieta normal e hipercalórica de ratos. Flavonóides constituem um dos grupos fenólicos mais frequentemente encontrado naturalmente e são ubíquos em todas as partes de plantas verdes. O consumo de flavonóides deve ser benéfico porque ao interagir com vários sistemas biológicos apresentam atividade antiinflamatória, hipolipidêmica, hipoglicêmica e antioxidante. Estudos têm apontado que a peroxidação de lipídios está envolvida em várias anormalidades fisiológicas e patológicas, tais como envelhecimento, inflamações e doenças cardíacas. O extrato metanólico de bananas verdes foi obtido; depois de evaporado o solvente, os componentes apolares foram sequencialmente extraídos por meio de hexano; a partição aquosa que continha flavonóides foi concentrada e utilizada no estudo. Os animais foram alimentados com uma dieta hipercalórica em grupos. Em um deles foram adicionados os flavonóides enquanto que em outro não, além do grupo controle com dieta normal. A presença de flavonóides demonstrou ter efeito antioxidante. A banana poderia ser associada a uma dieta equilibrada e protetora contra estresses oxidativos.

Coelho-Ferreira (2009) demonstrou a importância de conhecimento de plantas medicinais em Marudá, estado do Pará, na costa Amazônica. Os dados foram coletados de 1996 a 1998, por meio da observação, entrevistas semi-estruturadas e diálogos informais com os habitantes locais e especialistas em plantas, coletando espécimes das mesmas. A biodiversidade da Amazônia litorânea agregou importantes conhecimentos à medicina tradicional local, foram catalogadas 229 plantas medicinais, distribuídas em 81 famílias botânicas, que podem ser base de futuras pesquisas em fitoterapia. As indicações terapêuticas eram para tratamento de doenças conhecidas e patologias percebidas por uma perspectiva cultural local, ressaltando a forma de preparo e a parte da planta utilizada. *Musa* foi utilizada para diarreia com *Oxiurus*, tomando-se o chá da casca da banana roxa. O conhecimento gerado pode ser utilizado como terapias alternativas no Sistema Único de Saúde com potencial de promover a saúde na população a baixo custo.

Deshmukh et al. (2009) descreveram a importância de conhecer as diferentes composições químicas entre os cultivares de bananeiras na Índia para aprimorar seu valor de mercado e apresentar as vantagens de componentes químicos de uma sobre a outra. A presença de polifenol oxidase pode elucidar maior tempo de prateleira do produto, além de outros compostos tais como flavonas, fenóis e minerais que são essenciais para a nutrição humana e podem caracterizar princípios bioativos para uso medicinal. A banana é um produto importante na alimentação mundial com 88 milhões de toneladas métricas por ano ocupando uma área de cultivo de 10 milhões de hectares e a Índia possui a maior produção mundial. Além de ser venável *in natura*, pode ser feito cerveja ou vinho a partir da banana, petiscos desidratados, farinha e suco; o pseudocaule pode ser usado para fazer sapé, tecidos, cordame e como cobertura do solo em técnicas agrícolas. São encontradas nas regiões tropicais e subtropicais aproximadamente 30 espécies do gênero *Musa* e, dependendo da região que são cultivadas, recebem denominações diversas apesar de serem muitas vezes da mesma espécie e

do mesmo cultivar. A composição química pode esclarecer melhor a correta identificação de cada uma, independente da segregação e variação local. O crescimento de frutas tropicais sob luz solar intensa lhes proporciona algumas moléculas importantes para evitar a peroxidação, principalmente na casca e na polpa do fruto, entre elas algumas enzimas purificadoras antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, carotenóides) e hidrossolúveis (ascorbato, glutathione, flavonóide). Frutos de 11 cultivares foram coletados de pomares do sudoeste de Maharashtra, e também de partes de Karnataka, na Índia, num estágio de amadurecimento ainda amarelo esverdeado. Uma parte das frutas foi descascada e liquidificada com água deionizada, depois centrifugada a 4500 g por 15 min (4°C). O sobrenadante foi colhido e usado para o ensaio de antioxidantes. A porção insolúvel foi extraída com acetona e novamente centrifugada e também usada no ensaio de antioxidantes. Outra parte das frutas foi liofilizada e pulverizada e as amostras armazenadas a -20°C até sua análise. As amostras de casca de banana, sem o ápice e o caule, foram imersas por 20s em água fervente para inativar a polifenol oxidase, em seguida picadas e liquidificadas com água destilada, depois centrifugadas a 8000 g, submetidas à diálise durante 12 horas e depois concentradas em evaporador para serem usadas no ensaio de antioxidante. Foi observado que os resultados dos valores nutricionais de cada cultivar dependiam da variação de solo e climática de suas regiões. Claramente notou-se diferença dos constituintes químicos entre os cultivares. A vitamina C tinha mais concentração em frutos mais compridos. Os carotenos, fonte de vitamina A, mostraram pouca quantidade neste estudo diferindo de outros estudos realizados. A atividade da polifenol oxidase mostrou-se menor no cultivar Jawari e maior em Grand Naine. O cultivar Cavendish apresentou excelente atividade antioxidativa, na análise das cascas do fruto, atribuída à presença de catecolaminas. Neste estudo a presença de ácidos fenólicos foi pequena. Na análise das concentrações dos minerais pôde ser observado que o aumento da concentração de um leva à elevação da concentração de outros. Na análise multivariável foi verificado que Basrai e Cavendish são o mesmo cultivar.

Jawari e Shrimanti se destacaram dentre os outros cultivares por serem de maior potencial nutricional.

Martins et al. (2009) mostraram atividade antiviral de extratos da inflorescência de *Musa acuminata* contra o herpes vírus simples humano tipo I e tipo II (resistentes ao Aciclovir). As inflorescências de banana ouro foram extraídas em Petrópolis, no estado do Rio de Janeiro, picadas com faca, maceradas e feita a extração estática com etanol, trocando o solvente 20 vezes de 48 em 48 horas. Depois de concentrado no rotaevaporador e seco o resíduo foi submetido à partição líquido/líquido com os seguintes solventes em sequência: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. O extrato e as partições foram estocadas a -20°C depois de solubilizadas em 1% DMSO e adicionada água destilada para atingirem uma concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$ e filtrados e Millipore de 0,22 mm. As células utilizadas foram de fibroblasto de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (Vero). Todas as amostras apresentaram concentrações citotóxicas, sendo que foram utilizadas para a análise antiviral apenas aquelas que não provocaram alterações na morfologia celular, que variaram entre 25 a 200 $\mu\text{g/ml}$. Cada fração foi testada quanto à atividade antiviral. O extrato butanólico foi o único que apresentou inibição para as duas amostras testadas de vírus apresentando resultados superiores a 80%. Os extratos de *M. acuminata* testados constituem potencial uso em terapias antivirais.

Bankar et al. (2010) propuseram o uso de resíduo de casca de *Musa paradisiaca* para sintetizar nanopartículas de ouro, que podem ser utilizadas em catálise, óptica, óptica eletrônica, microeletrônica, biodiagnóstico, imaginologia, técnicas de sensibilidade biológica e química. Metodologias para a obtenção de nanopartículas de ouro como a fotolitografia e nano-impressão são complexas, envolvendo vários passos, com custo elevado. O uso do extrato da casca de banana pulverizada é uma alternativa ecológica como material redutor. A aplicação antimicrobiana das nanopartículas de ouro também foi demonstrada. As cascas de

banana foram coletadas e lavadas, então fervidas em água destilada por 30 min, depois esmagadas em água destilada e filtradas através de tecido de musselina. O filtrado foi precipitado com volumes iguais de acetona resfriada, depois centrifugado, seco e pulverizado para ser utilizado nos experimentos. Para cada 10 mg de pó de extrato foi utilizado 1 mM de solução de ácido cloroáurico. A mistura foi incubada por 3 min em banho-maria a 80°C. A influência de pH foi testada nos níveis de 2, 3,4 e 5. Padronizando o pH em 3, a temperatura foi testada a 40, 60, 80, 100°C. O espectrofotômetro UV caracterizou as nanopartículas formadas. Os grupos funcionais do pó do extrato que poderiam estar envolvidos na síntese das nanopartículas de ouro foram avaliados por espectrofotômetro de transmissão na resolução 4 cm⁻¹. Duas linhagens de *Candida albicans* (BX ou BH) foram utilizadas para determinar a ação antifúngica, cultivadas no meio MGYB, enquanto que as linhagens de bactérias foram *Citrobacter kosari* (MTCC 1657), *Escherichia coli* (MTCC 728), *Proteus vulgaris* (MTCC 426), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 728), *Enterobacter aerogenes* (MTCC 111), *Shigella sp.* e *Klebsiella sp.*, cultivadas em Ágar nutriente. Pelo método de difusão em ágar, as amostras de nanopartículas de ouro com pH 5 foram colocadas nos poços, deixando difundir por 15 min a 4°C e depois incubadas de 24-48h a 37°C. Todos os testes foram feitos em triplicata. Uma variedade de nanopartículas se formaram quando as condições reacionais foram alteradas pelo pH, concentração de ácido cloroáurico, conteúdo de extrato de casca de banana e temperatura de incubação. Os produtos reacionais apresentaram cores vívidas e espectro UV característico de nanopartículas de ouro, tendo um tamanho médio de 300nm, formando microtubo e microfios na periferia da amostras secas. Os grupamentos carboxílicos, amina, hidroxila estavam envolvidos na sua síntese. O extrato de casca de banana não apresentou sozinho efeito antimicrobiano. As nanopartículas de ouro apresentaram efeito antifúngico para *Candida albicans*. Houve atividade antibacteriana contra *Shigella sp.*, *C. kosari*, *E. coli*, *P. vulgaris* e *E. aerogenes*; para *Klebsiella sp.* e *P. Aeruginosa* não houve

atividade bactericida, podendo as nanopartículas de ouro atuar como agente antibacteriano seletivo.

Bennett et al. (2010) quantificaram diferentes classes de fenóis associados às paredes celulares da polpa de diversos cultivares de *Musa acuminata* Juss. Realizando análises em dias distintos depois da colheita, avaliou-se a relação dos fenóis com o amadurecimento da banana mensurando sua atividade antioxidante e o seu benefício potencial à saúde. Os cultivares Terra, Mysore, Figo, Pacovan, Nanicão foram colhidas em Itapetinga, estado de São Paulo. As bananas foram armazenadas 110 dias após o florescimento controlando a temperatura de 20°C e umidade relativa do ar 90%. Foram recolhidas as amostras baseadas na emissão de etileno e na sua respiração, ao longo do pré e pós climatério e o primeiro estágio de senescência. As bananas foram descascadas, fatiadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido a -80°C. Foram detectados no extrato solúvel da polpa (+) catequina, galocatequina, (-) epicatequina, bem como taninos condensados; não estavam presentes antocianinas ou antocianidinas. Na fração solúvel da parede celular dois derivados de ácidos hidroxicinâmicos eram predominantes; na fração insolúvel a antocianidina delphinidina era predominante. Essas frações mostraram excelente ação antioxidante, sendo que os cultivares Nanicão, Figo, Pacovan e Mysore foram os de melhores resultados, mas Terra teve o pior resultado. A hidrólise ácida liberou vários monossacarídeos, enquanto que a hidrólise enzimática liberou um pico de oligossacarídeo. De um ponto de vista fisiológico, os dados da hidrólise enzimática foram mais representativos do que os da ácida, pois demonstram que enzimas digestivas podem também facilitar a absorção de compostos fenólicos de bananas. Esses resultados apontam a ação antioxidante da parede celular da banana que é de origem natural e que a mesma estaria biodisponível no intestino humano.

Swanson et al. (2010) isolaram uma lectina relacionada à jacalina de *Musa acuminata* que pode ser capaz de inibir a entrada de vírus HIV-1 na célula do hospedeiro. Essa lectina,

chamada “BanLec”, se liga a carboidratos, inclusive estruturas protéicas glicosiladas que formam o envelope viral, tal como no vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Hipoteticamente essa ligação poderia ocorrer entre BanLec e o envelope gp120 do HIV-1. Foi determinada a inibição primária do HIV-1 adaptado ao laboratório e originário de vários tropismos e subtipos. “BanLec” possui atividade antiviral potente contra HIV e o mecanismo de ação foi investigado para verificar se a lectina seria capaz de aderir ao envelope viral glicosilado, bloqueando sua infecção celular. Um ensaio de ligação enzimática imunosorvente confirmou a relação direta entre BanLec e gp120, indicando que BanLec pode reconhecer as estruturas de manose assim como o anticorpo monoclonal 2G12 o faz. Além disso, BanLec é capaz de bloquear a entrada do HIV-1 na célula como foi indicado pelos estudos de sensibilidade viral à temperatura, como também pela abrupta parada de produtos da transcrição reversa, na presença de BanLec. A provável atividade anti-viral de “BanLec” foi comparada a outras lectinas utilizadas em anti-virais atualmente disponíveis contra HIV-1 e obteve resultados favoráveis. Assim, “BanLec” é um potencial componente de fármaco anti-viral que poderia prevenir a transmissão sexual do HIV-1.

Ohla et al. (2011) determinaram por eletroforese de microchip componentes biologicamente ativos em bananas. Técnicas de separação molecular miniaturizadas baseadas em chip são atrativas pelo fato de serem seguras, reduzirem o consumo de reagentes, melhorar a portabilidade e, especialmente, devido à alta velocidade proporcionada pela mesma, podendo-se considerá-la como uma eletroforese capilar miniaturizada. Uma porção de 3,6g de polpa de banana foi amassada por um pilão e um gral, acrescentando-se, na sequência, 1 ml de metanol. A lise celular foi proporcionada por ultrassom por 20 min, centrifugada a 750 X g por 15 min, colheu-se o sobrenadante que foi centrifugado novamente a 13000 X g por 10 min, para depois ser armazenado a -20 °C. Foi utilizada luz UV em um comprimento de onda de 266 nm. Dopamina e serotonina foram identificadas por esta metodologia, também seus

precursores triptofano e tirosina, além de salsolinol um alcalóide isoquinolona em menos de 1 min. Depois de 10 dias de amadurecimento das bananas também foi encontrado um metabólito da tirosina a levodopa. A análise quantitativa do extrato por calibração externa revelou concentrações de serotonina, triptofano e tirosina de 2,7 a 7,6 µg/ml com desvios-padrão menores que 3,5%. Para validação dos dados, os compostos também foram avaliados por eletroforese de microchip acoplada ao espectrômetro de massas onde foram obtidos os íons 177 m/z da serotonina; 154 m/z da dopamina; 180 m/z do salsolinol; 205 m/z do triptofano; 182 m/z da tirosina; 365 m/z da maltose. A metodologia mostrou-se eficiente para a análise de misturas complexas como os componentes naturais provenientes da banana.

2.2 Medicação Intracanal

Estrela et al. (1999) discorrem que o hidróxido de cálcio é obtido por meio de reação de calcinação do carbonato de cálcio, transformando-o em óxido de cálcio para depois receber hidrogênio. Ele pode reagir com o dióxido de carbono e formar o carbonato de cálcio. Trata-se de um pó branco com pH alto (12,5), muito pouco solúvel em água (1,2 g/l, a 25°C). As propriedades podem ser prejudicadas pela reação com o dióxido de carbono, neutralizando o curativo que é básico.

Estrela et al. (2001) imergiram 588 cones de papel absorvente em inóculos de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, durante 3 minutos, e depois os colocaram em placas de Petri a fim de avaliar a atividade antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio. As placas foram preenchidas com as pastas: Ca(OH)₂ + soro; Ca(OH)₂ + paramonoclorofenol canforado; Ca(OH)₂ + clorexidina 1%; Ca(OH)₂ + lauril sulfato de sódio 3%; Ca(OH)₂ + Otosporin[®]. Nos intervalos de 1 min, 48 h, 72 h e 7 dias os cones foram removidos e imersos em meio Letheen Broth, incubando-os a

37°C por 48 h. O crescimento foi avaliado pela turbidez das soluções. Sob as condições deste estudo não houve diferença de tempo de ação antimicrobiana entre os diferentes veículos testados, pois todos obtiveram atividade após 48 h.

Valera et al. (2001) testaram a eficácia de diversas medicações intracanal contra cepas de *C. albicans*. O estudo foi realizado com a contaminação de 70 dentes extraídos, preparados e esterilizados previamente. Essa etapa foi seguida pela instrumentação dos canais radiculares e preenchimento com os respectivos curativos de demora: Calen (Ca(OH)_2 + Óxido de Zinco + Polietileno Glicol 400 + Metil celulose); paramonoclorofenol canforado (PMCC); iodato de iodo; tricresol; Calen PMCC (Ca(OH)_2 + Polietileno Glicol + PMCC); apenas irrigação com hipoclorito de sódio 1% - sem curativo de demora; nenhum curativo de demora e nenhum procedimento. Permaneceram 14 dias a 37°C em ambiente úmido. Decorrido este tempo, os medicamentos foram removidos com irrigação de soro fisiológico estéril. Amostras foram colhidas com cones de papel absorvente e, depois de inoculadas em solução, foram semeadas em placas com ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol, incubadas a 37°C durante 48 h. Colônias puras identificadas bioquimicamente foram confirmadas pelo “killer factor”. Paramonoclorofenol canforado foi eficaz em todas as amostras seguido respectivamente pelo Calen PMCC (70%), hipoclorito de sódio 1% (70%), tricresol (60%), iodato de iodo (50%) e Calen (30%).

Estrela e Holland (2003), em uma revisão sistemática da literatura, averiguaram que o Ca(OH)_2 é capaz de induzir a formação de uma ponte mineralizada sobre o tecido pulpar. Comprovadamente os íons hidroxila possuem uma atividade antimicrobiana por meio de inativação da atividade enzimática bacteriana, no entanto é necessário que eles estejam disponíveis durante o tempo necessário para que isso ocorra. As enzimas da membrana citoplasmática de bactérias são sítios de ação do Ca(OH)_2 , lembrando que entre os microorganismos a estrutura da membrana citoplasmática é muito similar, independente das

características tinto-morfo-respiratórias das bactérias, como também de sua capacidade metabólica, o que torna o espectro de ação do Ca(OH)_2 bastante amplo. O tratamento realizado em duas consultas, com o uso de medicação à base de Ca(OH)_2 , promove melhores resultados no processo de cicatrização periapical do que o tratamento em sessão única.

Vianna et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermédia* constatando que as pastas de hidróxido de cálcio testadas (veículos: água estéril, glicerina, paramoclorofenol canforado (PMCC), PMCC + glicerina, Polietileno Glicol e PMCC + Polietileno Glicol) levaram mais tempo para eliminar bactérias anaeróbias facultativas do que as anaeróbias estritas. O tempo necessário para eliminar os aeróbios e anaeróbios facultativos variou de 6 h a 24 h, enquanto que os estritamente anaeróbios levaram de 30 s até 5 min. Sugere-se que a atividade antimicrobiana está relacionada tanto à formulação das pastas quanto à susceptibilidade microbiana.

Leonardo et al. (2006), em um experimento com cães, fizeram tratamentos endodônticos em elementos dentários com lesão periapical em quatro grupos: sessão única, com obturação dos canais radiculares usando guta-percha e o cimento AH-Plus; curativo de Ca(OH)_2 durante 15 dias e depois obturação com os mesmos materiais; mesmo curativo por 30 dias, em seguida obturação; 180 dias com o curativo de Ca(OH)_2 . Os cães foram sacrificados passados 180 dias e o exame histopatológico foi realizado para avaliar o grau de cicatrização periapical que aconteceu nos diferentes grupos. Os grupos que tiveram uso de medicação intracanal de Ca(OH)_2 tiveram estatisticamente melhor reparo do que aqueles que receberam tratamento em sessão única.

Revisando sistematicamente a literatura, Lin et al. (2007) encontraram poucos estudos randomizados e controles clínicos longitudinais comparando tratamentos endodônticos realizados em sessão única em relação à terapia em múltiplas sessões com a utilização de

medicações intracanal. Em casos de persistência de exsudato e sintomatologia estaria melhor indicada a terapia com múltiplas sessões para existir a possibilidade de ação dos medicamentos intracanal eleitos. Os autores ressaltam a indicação para tratamento em sessão única para periodontite apical assintomática, justificando o uso de avanços tecnológicos disponíveis atualmente, como instrumentos rotatórios e de níquel-titânio. O preparo do terço apical radicular deve ser conduzido de forma a alargá-lo para aprimorar a ação dos irrigantes endodônticos e na erradicação de bactérias.

Murad et al. (2008) avaliaram a invasão bacteriana pela coroa dentária, observando que existe inibição químico-mecânica causada por pastas à base de Ca(OH)_2 . Foram testadas associações com Polietileno glicol (PEG) e paramonoclorofenol canforado (PMCC); água destilada; Polietileno glicol; Glicerina. Respectivamente, as pastas que tiveram menor infiltração bacteriana foram citadas de maneira que houve diferença estatisticamente significativa entre as pastas compostas com PEG + PMCC e a que tinha glicerina, a primeira sendo mais eficaz.

Al-Nazhan e Al-Obaida (2008) testaram o uso de Ca(OH)_2 associado à clorexidina contra *C. albicans* em uma pesquisa *in vitro*. Uma suspensão da levedura foi exposta ao Ca(OH)_2 , à clorexidina (2%) e a uma mistura dos dois. As substâncias testadas foram incubadas por 1 h, 24 h, 72 h, verificando-se que todas as misturas foram eficazes em todos os intervalos avaliados, com exceção da exposição do Ca(OH)_2 por 1 h que não teve efeito antifúngico nesse período. A combinação de Ca(OH)_2 com clorexidina mostrou ser um antifúngico eficaz.

Desai e Chandler (2009) fizeram um levantamento da literatura de estudos clínicos e laboratoriais de cimentos endodônticos à base de Ca(OH)_2 comprovando mais uma vez que sua atividade bactericida depende da disponibilidade de íons hidroxila. Seu pH altamente alcalino estimula o reparo e ativa a calcificação. Existe uma resposta degenerativa inicial em

sua adjacência, seguida rapidamente por mineralização. O ambiente alcalino neutraliza o ácido láctico proveniente de osteoclastos e previne a reabsorção de estruturas dentárias e, também, ativa a enzima fosfatase alcalina que tem importante papel na deposição de tecido duro. Possui a capacidade de desnaturar proteínas de dentro do canal, tornando-as menos tóxicas. A ativação da reação cálcio-dependente da adenosina trifosfatase, associada à formação de tecido duro, é dada pelo hidróxido de cálcio. O fato de conseguir atravessar os túbulos dentinários e entrar em contato com o ligamento periodontal estimula o reparo e paralisa a reabsorção radicular.

Gomes et al. (2009b) avaliaram a ação de medicação intracanal na superfície externa radicular. 312 raízes de caninos extraídos foram tratadas, esterilizadas, eliminando do estudo aquelas com a presença de qualquer fratura ocorrida pela manipulação e evidenciada em microscopia de varredura. As medicações foram inseridas no canal radicular e depois o mesmo foi selado. Os dentes foram dispostos sobre o ágar para que houvesse a difusão através dos túbulos dentinários para o meio de cultura específico para cada micro-organismo testado, por 2 h e, depois, incubados. Foi ainda observada a presença e a ausência de cimento radicular nos dentes, havendo grupos distribuídos uniformemente para ambos. A ação antimicrobiana, do mais forte ao mais fraco medicamento foi, respectivamente: clorexidina 2%, clorexidina 2% + Ca(OH)₂, óxido de zinco + clorexidina 2% + Ca(OH)₂, soro fisiológico + Ca(OH)₂. Não houve diferença entre a presença ou ausência de cimento radicular e os testes foram feitos contra as cepas de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*. A clorexidina mostrou ter boa difusão através dos túbulos dentinários sendo eficiente na atividade antimicrobiana sobre a superfície externa radicular.

Queiroz et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de pastas para preenchimento de canal em tratamento endodôntico de decíduos. Foi feito o teste contra as

cepas de *Kocuria rhizophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* usando a técnica de difusão em ágar pelo método do poço. As pastas que tiveram maior eficácia foram, respectivamente: cimento de óxido de zinco e eugenol, Calen (Polietileno glicol + $\text{Ca}(\text{OH})_2$) espessado com óxido de zinco, Sealapex ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e EndoREZ. Foram utilizados como controle a pasta Calen, clorexidina (1%) e água destilada. Ressalta-se que Calen + óxido de zinco teve a maior atividade antibacteriana contra *E. faecalis* (seu halo foi maior que aquele obtido pela clorexidina 1%), tendo a mesma eficiência que o cimento de óxido de zinco e eugenol contra *S. aureus*.

Athanassiadis et al. (2010) investigaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de medicações intracanal contra *E. faecalis*, dentre elas, pasta Pulpdent, pasta Ledermix, mistura 1:1 de ambas anteriores, réplica de Ledermix manipulando-se PEG 400 / 3350, água, 3.2% dimeclociclina HCl, óxido de zinco, cloreto de cálcio, trietanolamina, sulfito de sódio e Germaben IIE, excluindo apenas o corticosteróide (triamcinolona); as réplicas das bases dos veículos das pastas também foram testadas, água e metilcelulose no caso de Pulpdent, água e PEG 400/3350 para Ledermix. Foram colhidas de uma placa de ágar de sangue de cavalo (HBA) 4 a 5 colônia de *E. faecalis* e cultivadas em 10 ml de caldo de cérebro/coração (BHI), incubadas a 35°C por 24h. O inóculo foi padronizado a escala 0,5 de McFarland. 3 discos de filtro de membrana de nitrocelulose de 0,2µm estéreis foram dispostos sobre uma placa de HBA, com a intenção de averiguar a atividade antimicrobiana após 1, 3 e 5 dias, além de outros 4 discos adicionais para servirem de controle, os quais foram colhidos conforme os filtros teste iam sendo colhidos. Essa metodologia mantinha a viabilidade do biofilme provendo nutrientes de sua base de ágar inferior, já que o mesmo tem vida útil de 7 dias antes que comece a ressecar e perca suas propriedades. Uma suspensão de 20 µl do caldo foi colocado no centro de cada disco de filtro, depois que o inóculo foi absorvido pelo meio, as placas de HBA foram incubadas por 48h a 35°C. Sobre 3 lamínulas de vidro estéreis de 22mm

foi disposto 0,1g da amostra, para depois serem invertidas sobre os discos de filtro incubados com o biofilme de maneira a permitir que houvesse contato direto entre a pasta e todo o biofilme, sem ultrapassar as bordas dos discos, eliminando a chance de haver bolhas de ar entre ambos, incubando-se, por fim, as placas por 5 dias a 35°C. Foram dispostas lamínulas da mesma maneira sobre os filtros incubados com biofilme sem nenhuma medicação, como controle e eram removidos juntamente com os discos testes na mesma oportunidade para servirem de referência para contagem de UFC e possibilitar a determinação do índice de sobrevivência bacteriana (ISB). Nos tempos de 1, 3 e 5 dias foram removidos os respectivos discos teste e controle com suas lamínulas, colocando cada conjunto em um tubo com 10 ml de água destilada estéril para então serem levadas ao vórtex por 1 min. Foi feita uma diluição seriada a 10^{-6} em 2 ml de caldo de triptona de soja, com alíquotas de 200 µl. Cada solução obtida, inclusive aquela que não foi diluída, foi plaqueada em ágar HBA com 100 µl e incubadas por 24h a 35°C. As colônias foram contadas para cada placa e a UFC determinada multiplicando esse número pela diluição (10^{-1} até 10^{-6}) e por 100. O ISB foi obtido dividindo a UFC (teste) pela UFC (controle) multiplicada por 100, sobre esse valor calculou-se o log na base 10. Como comparação, se o log na base 10 fosse feito usando apenas os dados do controle, esse seria sempre igual a 2. Cada experimento foi repetido 6 vezes. Pulpdent produziu a maior redução do ISB, seguida pela mistura 1:1 de Pulpdent e Ledermix. Ledermix, sua réplica e os veículos individuais não mostraram redução significativa no ISB para *E. faecalis*. As preparações com hidróxido de cálcio tiveram maior potencial inibitório para reduzir a sobrevivência de *E. faecalis* em uma reprodução laboratorial de seu biofilme.

Jhamb et al. (2010) compararam o efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 e da CHX contra *E. faecalis*. Existem micro-organismos que resistem após o preparo biomecânico dos canais radiculares, mesmo sendo realizado conforme os protocolos terapêuticos, dentre eles o de maior prevalência é o *E. faecalis*. As substâncias avaliadas foram CHX 0,2%, CHX 0,12%,

Ca(OH)₂ com água destilada, Metapaste com água destilada, Ca(OH)₂ com CHX 0,2%, Ca(OH)₂ com CHX 0,12%, Metapaste com CHX 0,2%, Metapaste com CHX 0,12%, ampicilina como controle positivo, utilizando-se o método de difusão em ágar. *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva sem mobilidade, podendo ser observada sozinha, aos pares ou em cadeias curtas; anaeróbia facultativa, fermenta glicose sem a produção de gás e não produz uma reação de catalase com peróxido de hidrogênio, podendo produzir uma reação de pseudocatalase quando cresce em ágar sangue (normalmente fraca), apresenta reação gamma para hemólise, produz uma redução do leite de tornassol, mas não liquefaz gelatina. São suscetíveis a vancomicina, enquanto que gentamicina e estreptomicina apresentam sinergia com efeito bactericida. A cepa foi inoculada em caldo de tripticase de soja por 12 h a 36.5°C. Após obtenção do inóculo ele foi semeado em placas de ágar de tripticase de soja e, depois de colocados os cones de filtro de papel estéril encharcados com as substâncias a serem testadas, foram incubadas por 72 h a 36.5°C. Os halos de inibição obtidos pela CHX mostraram-se significativamente maiores que os de Ca(OH)₂ provando ser um agente antibacteriano mais eficaz contra *E. Faecalis*.

Ramar e Mungara (2010) analisaram o tratamento endodôntico, em um acompanhamento *in vivo* longitudinal (clínico e radiográfico) de 96 dentes decíduos, feito com 03 composições diferentes de pastas de preenchimento. Em intervalos de 3, 6 e 9 meses foram feitos controles radiográficos evidenciando-se reparo ósseo, observando a sintomatologia clínica, sendo que apenas um elemento tratado apresentou, no retorno de 06 meses, a necessidade de exodontia. Óxido de zinco e eugenol + iodofórmio apresentou resultado clínico desfavorável apresentando excesso de material persistente e pouco reparo em comparação aos outros. Hidróxido de cálcio + iodofórmio apresentou reabsorção rápida, sendo que dos 30 dentes, 17 tiveram reabsorção de material de dentro dos canais radiculares; 6 dentes tiveram sucesso completo quanto ao reparo de tecido duro, enquanto que 16 dentes

tiveram um reparo parcial no período estudado. A pasta com Hidróxido de Cálcio + Óxido de zinco e eugenol + iodofórmio teve sua reabsorção acompanhando a rizólise do dente decíduo. Vale ressaltar que com o uso da última pasta houve um reparo completo das lesões de 17 dentes (54,8%).

Badr et al. (2011) compararam o Ca(OH)_2 com uma medicação endodôntica a base de alcaçuz, avaliando sua citotoxicidade e efeito antibacteriano contra *E. faecalis*. Para determinar a citotoxicidade foram utilizadas culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano. O alcaçuz combinado ou não ao Ca(OH)_2 , teve sua atividade antibacteriana avaliada pelo método da difusão em ágar por poços, teste de microdiluição e ensaios de suscetibilidade do biofilme. Alcaçuz teve sozinho ou combinado ao Ca(OH)_2 maior efeito bactericida contra *E. faecalis* do que Ca(OH)_2 sozinho. O uso de alcaçuz teve maior biocompatibilidade do que Ca(OH)_2 , que teve forte efeito letal às células. O extrato de alcaçuz ou sua combinação com Ca(OH)_2 tem maior efeito bactericida e possui mais biocompatibilidade em comparação com a medicação de Ca(OH)_2 normalmente usada na Endodontia.

Kayaoglu et al. (2011) testaram a atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* de 2 amostras de própolis comparadas a agentes irrigantes endodônticos. Blocos de dentina padronizados foram contaminados com *E. faecalis*. O espaço do canal radicular foi preenchido com um dos extratos etanólicos de própolis, CHX 2%, Ca(OH)_2 , etanol ou solução salina de tampão fosfato como controle. A dentina radicular foi amostrada após 1 ou 7 dias usando uma broca de tamanho padrão. O aglomerado de raspas dentinárias foi centrifugado vigorosamente em solução tampão de fosfato e alíquotas foram cultivadas em placas de ágar tripton de soja. As colônias foram contadas após dois dias de incubação. Todos os agentes reduziram significativamente o número de bactérias cultiváveis. A clorexidina foi o mais potente desinfetante em ambas as vezes. Comparado com o controle de etanol, não houve redução significativa no número de colônias para os extratos de própolis

após um dia, no entanto, o resultado foi significativo após sete dias. As duas amostras de própolis foram estatisticamente semelhantes entre si e Ca(OH)_2 , mas uma das amostras também foi semelhante à clorexidina após 7 dias. Isso pode ser associado a uma maior concentração de flavonóides, um grupo de compostos ativos antibacteriano, nesta amostra específica, encontrados pela análise realizada por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas. A atividade antimicrobiana das amostras de própolis testadas neste estudo estava entre o Ca(OH)_2 e a CHX. Ambas as amostras de própolis foram eficazes antimicrobianos, porém, a sua atividade não excedeu a da CHX.

2.3 O papel de *Enterococcus faecalis* no Biofilme Polimicrobiano Endodôntico

Fabricius et al. (1982) observaram em um estudo com macacos amostras coletadas depois de expostos os canais radiculares por uma semana ao meio oral e selados sem tratamento algum, em três etapas: 90, 180 e 1060 dias. Encontrou-se entre 85 a 98% correspondentes a bactérias anaeróbias estritas, as mais frequentes eram as linhagens de bastonetes Gram negativos (*Peptostreptococci*, Bacteróides) e Gram positivos (*ActiBomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*), sendo os anaeróbios facultativos (*α -Hemolytic-streptococci*, *Enterococci*) encontrados em menor proporção.

Sundqvist (1994) verificaram em uma metanálise que a patogenicidade da flora polimicrobiana do canal radicular está relacionada à sinergia existente entre os microorganismos nele encontrados. A invasão microbiana tem início com o princípio da necrose pulpar e se estende até os tecidos periapicais em uma etapa final da doença. Por meio da análise cromatográfica dos produtos bacterianos, pôde-se ter uma visão mais apurada da taxonomia bacteriana. Aprofundando os conhecimentos das linhagens anaeróbias Gram-negativas, aquelas que eram genericamente chamadas de *Bacteriodes*, são agora chamadas de

Prevotella e *Porphyromonas*. Foram encontradas ainda *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus mitis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Actinomyces israelii*, *Propionobacterium propionicum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*. A variedade biológica se relaciona com a evolução da doença, de forma que conforme o ambiente do sistema de canais radiculares se torna gradativamente mais susceptível à presença de anaeróbios, pela falta de oxigênio, menos presença de micro-organismos aerófilos será evidenciada. A existência de microcomunidades de diferentes espécies torna o ambiente, que seria hostil para algumas, suportável. A presença de suprimentos nutricionais não deixa de ser importante, sendo determinante para a prevalência de uma espécie sobre a outra. Por esse motivo, as bactérias procuram nutrientes essenciais para algumas linhagens predominantes nos tecidos periapicais, tal como a vitamina K e o ferro - provido algumas vezes por Heme e Hemoglobina.

Sen et al. (1995) para avaliar a invasão microbiana nos túbulos dentinários, utilizaram cinco dentes molares superiores e cinco inferiores extraídos por acometimento de lesões periapicais. Depois de seccionados, desmineralizados e tratados para visualização em microscopia eletrônica de varredura, foram observadas espécies de cocos, bastonetes e fungos na forma de leveduras com penetração entre 50 e 150 μm , inclusive na parte coronária.

Waltimo et al. (1997) realizaram um estudo na Finlândia com 967 amostras microbiológicas de canais infectados que não responderam ao tratamento endodôntico convencional, dentre as quais 692 apresentaram crescimento microbiano. Sete por cento (47) tiveram crescimento de 20 linhagens de leveduras, sendo a mais comum a de *Candida albicans*. Fungos e bactérias usualmente foram encontrados juntos, havendo apenas 06 casos de culturas puras de fungos. Na maioria das vezes as leveduras estavam associadas às espécies de bactéria facultativa Gram-positiva de *Streptococcus*. Além disso, associadas ao fungo, foram isoladas de 12 canais as bactérias anaeróbias *Peptostreptococcus micros* (Gram-

positivo) e *Fusobacterium nucleatum* (Gram-negativo). A importância de encontrar infecções causadas apenas por fungos é que a presença desse micro-organismo nas infecções endodônticas deve ser levada em consideração a fim de combatê-las.

Baumgartner et al. (2000) por meio de PCR, com o fim de identificar cepas de leveduras de *C. albicans*, analisaram 24 amostras extraídas de infecções de canais radiculares e 19 obtidas por punção aspirativa de infecções de origem endodôntica. No material obtido pela aspiração não foi encontrado o fungo, no entanto em 21% das outras amostras ele estava presente, comprovando sua existência em infecções endodônticas.

Leonardo et al. (2000) verificaram a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos (AH Plus, Sealapex - Ca(OH)_2 , Ketac Endo – óxido de zinco, Fill Canal, Calen – Ca(OH)_2 , pasta de óxido de zinco) utilizando o método da difusão em ágar pelo método do poço e também com cones de papel absorvente contra as cepas: *Micmoccus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidemidis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* comumente resistentes em infecções endodônticas. Quando aplicados no poço, todos apresentaram halos de inibição de crescimento bacteriano, ao passo que ao se utilizar os cones de papel absorvente, a pasta de óxido de zinco não obteve resultado contra *E. faecalis*; AH Plus, Fill Canal e a pasta de óxido de zinco não obtiveram resultados contra *P. aeruginosa*. As técnicas de difusão em ágar são válidas, mas difíceis de serem empregadas para comparar os diversos materiais com viscosidade diferente, dissociação diferente no ágar, portanto atenção especial deve ser dada para evitar erros de interpretação.

Evans et al. (2002) estudaram mecanismos de defesa para sobrevivência microbiana em ambiente alcalino, em particular para *E. faecalis*. Foram simuladas exposições de concentrações subletais de hidróxido de cálcio ao patógeno. A bactéria também foi submetida a agentes bloqueadores da bomba de prótons da parede celular. Sua capacidade de invadir os túbulos dentinários justificaria sua resistência à exposição de hipoclorito de sódio, por

exemplo. Essa espécie apresenta uma resistência inata a ambientes alcalinos de pH até 11,1. A bomba de prótons pode ser uma forma de permitir que seu citoplasma permaneça com a acidez necessária para a sobrevivência, mantendo a homeostase para que suas enzimas e proteínas continuem funcionais. Quando o pH atingiu 11,5, nenhuma linhagem pôde resistir à ação do hidróxido de cálcio. Uma resposta adaptativa em pH alcalino e sob indução de estresse parece trazer pequena contribuição para a sobrevivência desse micro-organismo.

Mickel et al. (2003) utilizando a técnica de difusão em ágar, dispuseram discos com cimentos endodônticos (Sealapex - $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Roth 811, Kerr EWT e AHPlus) e antibiótico (ampicilina) em placas de Petri com ágar sangue inoculadas com *E. faecalis*. Roth 811 apresentou a maior área de inibição (1,1 mm), seguido por Sealapex (0,8 mm) e Kerr EWT (0,5 mm), enquanto que AH-Plus não apresentou atividade antimicrobiana.

Nair et al. (2005), utilizando a técnica de tratamento em sessão única, fizeram as apicectomias de 16 raízes mesiais de primeiros molares inferiores imediatamente após a obturação dos canais. Foi observada a presença de cocos, bastões e bactérias filamentosas, na maioria das vezes organizadas em biofilmes, por meio de exame histopatológico e microscopia eletrônica de transmissão nos istmos entre canais, canais acessórios, delta apical e regiões de acesso restrito aos instrumentais utilizados em Endodontia. As raízes foram obturadas com gutta-percha e cimento à base de óxido de zinco e eugenol, depois de feito o preparo biomecânico, irrigando-as com hipoclorito de sódio a 5,25% e condicionamento por ácido etilendiamino tetracético (EDTA) a 17% (10 ml). Enfatizou-se a necessidade de uma etapa química para erradicar os micro-organismos no sistema de canais radiculares.

Stuart et al. (2006) demonstraram que o *E. faecalis* tem sido mais evidenciado em lesões refratárias do que em infecções endodônticas primárias, principalmente em casos em que as lesões são assintomáticas. Apesar disso, sua virulência está relacionada a vários fatores, como sua habilidade em resistir às técnicas endodônticas, persistindo nos túbulos

dentínários e nos canais radiculares. A fim de atingir esse micro-organismo, sugere-se uma técnica realizada em duas consultas. É importante manter a cadeia asséptica e fazer a instrumentação adequada do periápice radicular. O uso de hipoclorito de sódio a (6%), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA - 17%) e clorexidina (2%) como soluções irrigadoras durante o preparo dos canais radiculares é indicado. Como medicação intracanal emprega-se a clorexidina gel (2%) ou associada ao hidróxido de cálcio. A obturação do canal radicular e restauração dentária devem ser satisfatórias.

Gomes et al. (2006) comprovaram a presença de anaeróbios estritos nas infecções endodônticas primárias e recidivantes. Foi feita a análise de amostras obtidas de 100 canais radiculares, sendo 50 de cada caso. Extraiu-se o DNA das amostras e analisou-se por meio de PCR com “primers” espécie-específicos. *Filifactor alocis* (associado à dor, inchaço, exsudato, abscesso), *Tannerella forsythia* (sensibilidade à percussão, mobilidade, exsudato, abscesso) foram encontrados com maior frequência em infecções primárias e *Treponema denticola* (mobilidade, exsudato, abscesso) tanto nas primárias quanto nas recidivantes, fazendo uma associação da presença dos micro-organismos com os sinais e sintomas em um nível de 5% de significância.

Chivatxaranukul et al. (2008) investigaram a predileção e invasão de *E. faecalis* pelos túbulos da dentina radicular. 16 cortes transversais de raízes intactas ou instrumentadas de dentes humanos extraídos, com ou sem a presença de lama dentinária, foram utilizadas para verificar experimentalmente *ex vivo* a invasão dos túbulos por *E. faecalis*, depois de 8 semanas de incubação. A estimativa do grau de invasão foi comparada entre os grupos pelos dados observados histologicamente. 44 raízes seccionadas longitudinalmente foram estudadas para verificar a aderência de *E. faecalis* incubados por 2h aerobicamente. A análise foi feita por microscopia eletrônica de varredura, calculando-se o número de células a cada 100 μm^2 . A invasão observada foi considerada moderada a severa. A adesão ocorreu significativamente

melhor na dentina fraturada do que nas paredes intactas. Com respeito à aderência das paredes do túbulo dentinário, as internas sofreram maior aderência do que as externas, sendo obtidos resultados melhores quando as bactérias estavam no meio de cultura em comparação ao soro fisiológico. Embora *E. faecalis* tenha invadido os túbulos, não apresentou preferência de adesão pelas paredes dos mesmos, não existindo diferença quando os túbulos eram repletos de fibrilas colágenas ou não. Sua colonização inicial provavelmente depende da influência de outros fatores.

Jacinto et al. (2008) não associaram sinais e sintomas a *Fusobacterium nucleatum* e *Fusobacterium necrophorum*, encontrados como principais representantes de bactérias anaeróbias de um levantamento de 110 amostras de dentes comprometidos por infecções periapicais. O total de 580 linhagens individuais foi isolado por métodos de cultura, dentre as quais 81,4% eram anaeróbias estritas. *Fusobacterium nucleatum* estava associado a *Prevotella spp.*, *Eubacterium spp.* e *Porphyromonas gingivalis*. *Fusobacterium necrophorum* estava associado à *Peptostreptococcus prevotii*. É comum ser encontrada *Fusobacterium spp.* em infecções primárias.

Testando a eficácia de evidenciar a presença de micro-organismos por cultura ou pela técnica de PCR, Gomes et al. (2008) comprovaram a presença de *Gemella morbillorum* em infecções primárias endodônticas e persistentes, coletando 50 amostras de cada. A cepa foi encontrada mais frequentemente em infecções primárias e foi acusada com maior frequência por meio de PCR.

Kayaoglu et al. (2008) correlacionaram a expressão genética de fatores que propiciam adesão ao colágeno pelo *E. faecalis* determinada pelo gene *ace* a resistência do mesmo aos antimicrobianos usuais na Endodontia. Duas linhagens de *E. faecalis*, selvagem (OG1RF) e mutante (TX5256 com *ace* inserido de OG1RF), foram ativadas em caldo cérebro-coração a 46°C por 12h. Suspensões de bactérias padronizadas foram pré-tratadas durante 1 h com

colágeno ácido-solúvel ou solução salina fosfatada tampão acidificada (PBS). As bactérias foram expostas à clorexidina (CHX), iodeto de potássio iodado (IKI), hipoclorito de sódio (NaOCl) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). Amostras foram colhidas nos intervalos de 1, 3 e 6 h e cultivadas em ágar Todd-Hewitt, contando-se as UFCs. A amostra selvagem foi mais resistente que a mutante a IKI, NaOCl e Ca(OH)₂. A bactéria selvagem exposta ao colágeno foi mais resistente do que a exposta a PBS contra CHX a 3h e contra IKI a 1h, não houve diferença significativa para NaOCl. A amostra mutante tratada com colágeno ou PBS não teve diferenças significantes no desafio com CHX, IKI e NaOCl. O desafio com Ca(OH)₂ mostrou que tanto a selvagem quanto a mutante, após tratamento com colágeno, se tornavam mais suscetíveis em comparação ao tratamento com PBS. A presença do gene *ace* confere resistência contra IKI, NaOCl e Ca(OH)₂ para *E. faecalis*. A exposição ao colágeno torna a bactéria selvagem mais resistente contra CHX e IKI, entretanto a torna mais suscetível ao Ca(OH)₂.

Rôças et al. (2008) associaram a periodontite apical pós-tratamento à presença de micro-organismos em lesões persistentes quando feito um teste PCR espécie-específico. Foram incluídos no estudo 17 dentes tratados há um ano com evidência radiográfica de periodontite apical. Detectou-se *Streptococcus spp.* (47%), *Lactobacillus spp.* (35%), *Dialister invisus* (29%), *Eubacterium infirmum* (29%), *Prevotella intermedia* (29%), *Selenomonas sputigena* (29%), *Synergistes* (clone oral BA121 - 29%), *Treponema denticola* (29%), *E. faecalis* (47%) e *C. albicans* (6%). As infecções foram caracterizadas como mistas e *E. faecalis* não se mostrou a espécie mais presente em nenhuma destas infecções mistas, no entanto, dentre os diferentes dentes analisados, foi a encontrada com mais frequência. Deve-se levar em consideração outras bactérias patogênicas importantes nas infecções endodônticas.

Salah et al. (2008) avaliaram a ocorrência de *E. faecalis*, seus fatores de virulência e sua associação à presença ou ausência de outras doenças bucais em uma amostra populacional

jordaniana. Nas afecções orais tais como gengivite, periodontite, infecções endodônticas refratárias e cárie os pacientes têm apresentado *E. faecalis* em seu biofilme bucal. Sua cooperação em biofilmes aeróbios e anaeróbios tem sido descrita, especialmente envolvidos na periodontite apical crônica. Os fatores de virulência do *E. faecalis* incluem aderência ao tecido do hospedeiro, sua invasão e formação de abscesso; modulação de respostas inflamatórias do hospedeiro, secreção de vários produtos que favorecem o crescimento do biofilme. A presença de *E. faecalis* em isolados de infecções radiculares refratárias expressam sua resistência ao tratamento convencional. 159 sujeitos, sendo 50 saudáveis do grupo controle, foram examinados por 2 dentistas que avaliaram a presença de cárie dentária, gengivite e patologias endodônticas. A idade dos pacientes era de 14-75 anos, a prevalência de *E. faecalis* no bochecho bucal era 7,3%, não sendo encontrado *E. faecalis* naqueles que apresentavam saúde bucal. A identificação do micro-organismo foi feita por meios de cultura e PCR. Os fatores virulentos putativos nem sempre foram expressos, visto que hemolisina foi expressa apenas por 25% dos *E. faecalis* e gelatinase 37,5%. Outros estudos comprovaram a presença desses fatores em infecções endodônticas como resposta a feromônios. Ambos os genes *ace* e *efaA* eram presentes em *E. faecalis*, enquanto *cylA* foi detectado em apenas 2 isolados e nenhum mostrou o gene *esp* que geralmente está associado a infecções urinárias de *E. faecalis*. Esses resultados da expressão de hemolisina e gelatinase ou de seus genes variam provavelmente pela diversidade de sua origem clínica e também geográfica. No entanto, percebe-se que nem gelatinase e nem o gene *esp* são essenciais para a organização do biofilme. Parece que muitos fatores genéticos e ambientais podem estar associados à formação de biofilme por *E. faecalis*. Todos os isolados foram susceptíveis a ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, teicoplanina e vancomicina; 62,5% a eritromicina e 12,5% a imipenem; todos foram resistentes a gentamicina, clindamicina e oxacilina. Este estudo

mostrou que *E. faecalis* está associado à presença de várias doenças bucais e que os mesmos apresentavam os genes de antígeno da endocardite e da proteína de ligação ao colágeno.

Fujii et al. (2009) avaliaram que a microbiota de lesões com periodontite apical persistentes é composta por diversos tipos de micro-organismos com a capacidade de formação de biofilme, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Fusobacterium nucleatum*. A associação dos últimos três foi predominante dentre as 31 bactérias evidenciadas em 20 lesões periapicais, obtidas de 20 pacientes diferentes.

Ozbec et al. (2009) compararam a presença de *E. faecalis* nas infecções primárias endodônticas e em tratamentos endodônticos que falharam. Determinaram também a importância da presença deste patógeno em infecções endodônticas em uma população turca. Foram coletadas 79 amostras de pacientes, sendo 43 de tratamentos endodônticos que falharam e 36 com periodontite apical crônica. DNA foi extraído das amostras utilizando o “minikit QIAamp®” e analisado em PCR- tempo real com “SYBR Green”. *E. faecalis* foi detectado em 41 dos 79 pacientes, sugerindo que existem não menos que em 61% de todas as infecções endodônticas. PCR tempo-real permitiu a detecção de *E. faecalis* em 74.4% no grupo 1 e em 25% do grupo 2. Portanto *E. faecalis* é de grande prevalência em infecções endodônticas de pacientes da Turquia, tendo maior frequência em infecções secundárias do que primárias.

Subramanian e Mickel (2009) mostraram o perfil das espécies presentes no biofilme de lesões periapicais persistentes. Foi feito PCR tempo-real para análise do DNA microbiano de amostras de tecido periapical e ápice radicular, provenientes de biópsia após apicectomia de lesões persistentes, de 34 sujeitos que foram submetidos anteriormente a tratamento endodôntico e tinham restaurações satisfatórias. Detectou-se 141 espécies e filotipos diferentes em 33 sujeitos, não apresentando resultado apenas um dos casos em que a lesão foi

diagnosticada como displasia cementária apical pelo exame anatomopatológico, realizado paralelamente em todas as lesões coletadas. Dentre esse rol de bactérias encontradas nos dois nichos testados, tecido periapical e ápice radicular, 50% são representados pelos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Burkholderia*.

Zhang et al. (2009) estudaram a atividade antibacteriana contra *E. faecalis* de 7 tipos de cimentos endodônticos. A bactéria foi cultivada em ágar de soja tríptica (ST) e depois suspensa em água estéril a uma densidade de 3×10^8 UFC. Um teste de contato direto foi feito com os cimentos, sendo 1 de resina epóxica (AH Plus); 2 de resina polimetacrilato (Epiphany e EndoRez); 2 de Ca(OH)_2 (Apexit Plus e Sealapex); 1 de complexo de Ca(OH)_2 e silicato de cálcio (iRoot); 1 de óxido de zinco e eugenol (Tubli Seal). Depois de manipulados foram aplicados nos poços de uma microplaca em quantidades iguais e aguardou-se 20 min para sua presa. 10µl do inóculo foram sobrepostos sobre os mesmos e, sobre poços sem cimento, foram também colocados como controle. A incubação foi feita em ambiente de 100% de umidade a 37°C por 2, 5, 20 e 60 min para então ser adicionado 240 µl de caldo de ST misturando gentilmente com a ponta da pipeta por 1 min; a solução obtida em cada poço foi transferida e diluída serialmente na razão de 10 em caldo de ST; cada diluição foi semeada com 20 µl em placas com ágar de ST e incubadas por 24h a 37°C, na sequência foi feita a contagem das UFCs. Os experimentos foram feitos em triplicata, com tempos de coleta de 20 min (imediata), 1, 3 e 7 dias de incubação em atmosfera úmida a 37°C. A amostra imediata de iRoot matou todas as bactérias em 2 min, AH Plus em 5 min, EndoRez em 20 min, seguidos por Sealapex e Epiphany em 60 min, enquanto Apexit Plus e Tubli Seal falharam na coleta imediata. Nas amostras de 1 e 3 dias, iRoot e EndoRez tiveram os melhores resultados, seguidos por Sealapex e Epiphany, enquanto que Tubli Seal e AH Plus não tiveram resultados

significantes. Apexit Plus teve os piores resultados de todas as amostras. Sealapex e EndoRez foram os únicos com atividade antimicrobiana depois de 7 dias.

Al-Ahmad et al. (2010) examinaram se enterococci provenientes da alimentação são residentes do biofilme bucal. *E. faecalis* é uma preocupação primordial na Endodontia, no entanto enterococci são considerados apenas micro-organismos transitórios na cavidade bucal. Seis voluntários saudáveis utilizaram um aparelho com placas de esmalte dental inseridas no mesmo. Depois de 3 dias eles consumiram queijo contaminado com enterococci. O destino dos enterococci foi avaliado por meio de cultivo seletivo e por sequenciamento do gene 16S RNAr. Todos os isolados foram caracterizados genotipicamente por análise de macro-restrição e por eletroforese. *E. faecalis* foi também caracterizado pela hibridização fluorescente *in situ*. Depois de duas horas foram detectados *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* e *E. durans*, como também após 5 dias. As cepas isoladas do biofilme bucal comparadas às provenientes do queijo mostraram homogeneidade genética, exceto *E. durans*. Houve a integração de *E. faecium* e *E. avium* a um biofilme pré-existente de 3 dias. *E. faecalis* foi também encontrado no biofilme bucal pela hibridização fluorescente *in situ*. Enterococci provenientes da alimentação podem não ser apenas transitórios como também podem se incorporar ao biofilme bucal e se tornar fonte para infecções endodônticas.

Delgado et al. (2010) avaliaram a eficácia de eliminação de *E. faecalis* intratubular por gel de clorexidina (CHX) 2% e hidróxido de cálcio. O tratamento endodôntico é usualmente baseado na eliminação inespecífica de micro-organismos intrarradiculares. Existe a técnica de sessão única que tem sido descrita por alguns autores contra outros que sugerem o uso de medicação intracanal entre as sessões para atingir regiões não alcançadas pelo preparo biomecânico endodôntico. Dentes humanos unirradiculares foram tratados com Ca(OH)₂, CHX 2 %, Ca(OH)₂ e CHX 2 %, soro fisiológico (controle negativo). Amostras colhidas de uma profundidade de 0 a 100 µm e de 100 a 200 µm dos canais desses canais radiculares

tratados foram analisadas quanto à colonização de bactérias, contando-se o número de UFC e a viabilidade bacteriana por meio do microscópio de fluorescência. Um decréscimo significativo foi constatado na contagem de UFCs e na viabilidade de *E. faecalis* depois do tratamento com Ca(OH)_2 ou CHX comparados ao grupo controle, sobressaindo-se a CHX em relação ao Ca(OH)_2 , não se observando diferenças significativas dos resultados de CHX com a adição ou não de Ca(OH)_2 .

Ferrer-Luque et al. (2010) avaliaram a atividade bactericida contra *E. faecalis* do ácido maleico e também as combinações de cetrimida com ácido maleico, ácido cítrico e EDTA. Com a finalidade de incorporar propriedades diferentes em um único composto, agentes quelantes podem ser associados a soluções irrigadoras endodônticas, tais como o EDTA e o ácido cítrico. Recentemente o ácido maleico tem sido visto como uma alternativa de solução irrigadora por ter maior biocompatibilidade e promover melhor remoção da *smear layer*, mas sua atividade antimicrobiana ainda não foi avaliada. Os biofilmes de *E. faecalis* cresceram no aparelho de alta taxa de transferência MBEC por 24h e expostos às soluções irrigadoras por 30s, 1 min e 2 min. Erradicação foi definida apenas quando 100% das bactérias morreram. O teste *t* de Student comparou a eficácia das combinações de irrigantes. O ácido maleico erradicou o biofilme a uma concentração de 0,88% depois de 30s e de 0,11% depois de 2 min. Quando combinado com 0,2% de cetrimida e 15% de EDTA ou ácido cítrico obteve erradicação após 1 min. O ácido maleico apresentou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

Mathew et al. (2010) observaram a sobrevivência intracelular de *E. faecalis* (crescimento planctônico e em biofilmes) em macrófagos *in vitro*, como também a habilidade desse micro-organismo produzir fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina (IL)-6 depois de exposto a macrófagos. As infecções mediadas por *E. faecalis* têm alguns desafios na abordagem clínica como sua habilidade inata de suportar meios pobres em nutrientes,

alterações bruscas de pH e também concentrações salinas, somada a resistência a antibióticos. Apesar de sua prevalência na infecção primária endodôntica ser pequena, nas infecções refratárias pode ser o principal patógeno. Sua capacidade de resistir ao preparo químico-mecânico e de formar biofilme da dentina radicular, mesmo sob medicação e subnutrição, favorecem sua persistência nas infecções endodônticas secundárias. O crescimento em biofilme o torna mais resistente a resposta de macrófagos que o planctônico. Macrófagos vistos ao redor do forame radicular possuem bactérias fagocitadas. *E. faecalis* parece sobreviver a fagocitose e utilizar o macrófago para transporte pelas vias sanguíneas. É sabido que bacteremia ocorre durante infecções abscedadas e durante o tratamento endodôntico. Embora tenha sido estabelecida a patogênese de enterococci na endocardite e peritonite em experimentos com animais, seu papel ainda não está claro, sendo importante analisar a interação que acontece entre essas bactérias e o sistema imune do hospedeiro. Três linhagens de *E. faecalis* foram cultivadas em dentina em meio rico em nutrientes e outra em meio pobre. As células derivadas do biofilme foram incubadas com macrófagos humanos *in vitro*. Um ensaio fluorométrico quantificou a superfície de aderência bacteriana, considerando que um ensaio de proteção antibiótica foi usado para quantificar as células de *E. faecalis* internalizadas depois de 6 a 48h de interação com os macrófagos. A quantificação do TNF- α e da IL-6 foi feita por ensaio de imunossorvência enzimática. A aderência a superfícies e a sobrevivência de *E. faecalis* do biofilme com macrófagos foi significativamente maior que os planctônicos. *E. faecalis* sobreviveram até 48h e os planctônicos produziram níveis significativamente maiores de IL-6. Com exceção de uma linhagem, as outras produziram quantidades similares de TNF- α entre biofilme e planctônico.

Ma et al. (2011) observaram a habilidade do leucócito polimorfonuclear neutrófilo (PMN) de eliminar *E. faecalis*, também averiguando os mediadores inflamatórios liberados por essa interação e, ainda, a capacidade inflamatória de *E. faecalis* em tecido muscular de

rato. A infecção endodôntica é polimicrobiana; enterococci têm sido observados como patógenos presentes e normalmente habitam o trato gastrintestinal, vagina e a cavidade bucal como comensais e têm sido atores principais de infecções nosocomiais; na Endodontia seu poder de penetração nos túbulos dentinários radiculares permite sua reinfecção após o tratamento. Dentre as 15 espécies mais prevalentes de enterococci, representando não menos que 80% dos isolados clínicos, está o *E. faecalis*. Ele possui um número de fatores de virulência que podem estar associados a sua colonização, competição com outras bactérias, resistência contra os mecanismos de defesa e produção de toxinas direta ou indiretamente por intermédio da indução inflamatória. A presença de fatores estressantes como medicação intracanal, toxinas de outras bactérias e limitação nutricional são insuficientes para erradicar este micro-organismo. Esses fatores ambientais podem ter uma influência na expressão dos fatores de virulência de *E. faecalis*. PMNs são a primeira linha de defesa celular mais eficiente contra micro-organismos invasores. PMNs possuem mecanismos potentes oxidativos e não-oxidativos e pela produção de fatores reguladores imunitários e inflamatórios, como por exemplo, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina (IL)-1, além de enzimas proteolíticas como a matriz metaloproteinase-8 (MMP-8). Isso permitirá a ativação de PMNs e macrófagos no local da infecção, sendo o ponto de partida da resposta inflamatória. O experimento isolou 15 linhagens endodônticas de *E. faecalis* e 9 de saliva; cresceram em caldo de cérebro-coração e foram incubados com PMNs de ratos para avaliar a habilidade destes de matar as bactérias. Por meio de PCR tempo-real avaliou-se o RNAm de (IL)-1, (TNF- α), (MMP-8) e cicloxigenase (COX)-2 depois de expor os leucócitos às bactérias. A resposta inflamatória do tecido muscular dos ratos expostos à bactéria foi avaliada histologicamente. PMNs mataram em torno de 80% dos *E. faecalis* em 1 hora, independente da fonte do isolado. Os resultados quantitativos de PCR mostraram que o RNAm de IL-1, TNF- α , MMP-8 e COX-2 estavam marcadamente expressos em PMNs estimulados por *E.*

faecalis ou nos *E. faecalis* invasores do tecido muscular. O nível de expressão do RNAm de MMP-8 estava positivamente relacionado com a do RNAm de COX-2. A avaliação histológica e imunogênica mostrou que todos os *E. faecalis* recrutaram os PMNs para o local da infecção e provocaram a formação de abscessos.

Baca et al. (2011) avaliaram a atividade bacteriana residual e a capacidade de erradicação do biofilme de *E. faecalis* por meio de soluções irrigadoras usadas sozinhas ou combinadas em um teste de dentina-volumétrica. O uso de soluções irrigadoras de canais radiculares exercendo atividade antimicrobiana e efeito residual prolongado é desejável para o controle de infecção dentinária e reinfecção tardia do canal radicular. Soluções de hipoclorito NaOCl a 2,5%, CHX 2%, cetrimida 0,2% (CTR), EDTA 17%, ácido maleico 7% (AM), e protocolos de NaOCl 2,5% seguido de EDTA 17% ou 7% de AM e 0,2% CTR ou 2% CHX foram usados para determinar sua atividade residual, expondo blocos de dentina tratada a *E. faecalis* por 24 h. A atividade antimicrobiana foi avaliada em biofilmes formados por 3 semanas sobre a dentina em blocos. A solução de CHX e CTR apresentou 100% de inibição do biofilme; NaOCl apresentou a menor atividade residual (18,1%). O percentual de erradicação do NaOCl e do CTR foi de 100%, seguidos de AM e da CHX, enquanto EDTA foi o menos efetivo (44%). Soluções de AM ou de EDTA, seguidos pela CTR ou da CHX, apresentaram 100% de atividade residual e antimicrobiana. A solução de CTR sozinha e as combinações nas quais CHX ou CTR foram os irrigantes finais, atingiram a máxima atividade residual e antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de pastas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* contra *Enterococcus faecalis*.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Verificar a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato glicólico de *Musa paradisiaca* frente a *Enterococcus faecalis*;
- 3.2.2 Comparar a atividade antimicrobiana das pastas de Hidróxido de Cálcio e/ou Óxido de Zinco associadas ao extrato glicólico de *Musa paradisiaca* ou Polietileno glicol 400;
- 3.2.3 Verificar a Concentração Inibitória Mínima das pastas com extrato glicólico de *Musa paradisiaca* que obtiveram atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* por meio da Macrodiluição;
- 3.2.4 Caracterizar o extrato glicólico de *Musa paradisiaca* por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray - ESI-MS;
- 3.2.5 Caracterizar o extrato glicólico de *Musa paradisiaca* por Cromatografia de Camada Delgada - CCD;
- 3.2.6 Caracterizar o extrato glicólico de *Musa paradisiaca* por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

Trata-se de estudo prospectivo experimental que avaliou a atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* de pastas endodônticas compostas de Extrato glicólico de *Musa paradisiaca* (laboratório Mapric, São Paulo – SP) associado óxido de zinco e/ou hidróxido de cálcio.

4.2 Materiais

4.2.1 Extrato Fitoterapêutico

O conhecimento popular inspirou a realização deste estudo, a tradição de uso de plantas medicinais durante o tempo de vivência no interior do Amazonas, trouxe importante auxílio para esclarecer a importância de trazer para a rotina clínica essa experiência medicinal prática. Durante bom tempo, tentamos obter um extrato proveniente da seiva da bananeira que pudesse servir como solução irrigadora endodôntica ou medicação intracanal, mas não obtivemos sucesso em sua manipulação pelo fato de possuir componentes muito sensíveis à oxidação e provavelmente não estava adequada a metodologia de extração dos componentes para uso nos testes laboratoriais. Durante a revisão de literatura e levantamento de metodologias que pudessem solucionar os problemas que estávamos enfrentando, nos deparamos com um produto proveniente de um laboratório do estado de São Paulo que já se

tratava do extrato de banana manipulado. Por conseguinte, achamos que seria interessante encontrar novas aplicações a um produto que já tinha sido desenvolvido e que pudesse trazer possíveis propriedades antimicrobianas com a biocompatibilidade que procurávamos. Portanto, adquirimos o produto desenvolvido para fins cosméticos, por exemplo, a confecção de sabonetes, com o intuito de aplicá-lo como componente de uma provável medicação intracanal a ser desenvolvida.

O extrato glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB) (Figura 5) pode ser obtido pelo processo de maceração ou percolação da infrutescência da bananeira. Para a obtenção do extrato usualmente é utilizada uma solução hidro-glicólica como solvente ou líquido extrator, usualmente a glicerina ou Propileno glicol com certa quantidade de água. O extrato glicólico de banana possui aparência de um líquido límpido amarelo claro a castanho, com odor característico; densidade entre 1000 e 1100 g/cm³; pH entre 4,0 e 6,0; contagem de aeróbios totais, bolores, leveduras no máximo 100 UFC/g; ausência de coliformes e patógenos; solúvel em etanol, Propileno glicol, glicerina, sorbitol e água (MAPRIC, 2010).



Figura 5. Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB). Observa-se a coloração amarelo-clara translúcida.

O Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* foi adquirido do laboratório MAPRIC, São Paulo – SP (Anexo 1).

4.2.2 Linhagem Microbiana

A cepa utilizada nesta pesquisa foi gentilmente cedida da Bacterioteca, que tem como responsável técnica a Profa. Dra. Luciana Leomil, do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) do Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

Bactéria da “American Type Culture Collection” (ATCC)

Enterococcus faecalis (ATCC 29212)

4.2.3 Meios de Cultura

Müeller – Hinton Ágar (MHA) – Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Caldo Müeller – Hinton (MHB) - Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Luria Bertani Ágar (L B) - Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Caldo de Cérebro - Coração (BHI) – Merk KgaA, Darmstadt, Germany

Ágar de Cérebro - Coração (BHI) – Merk KgaA, Darmstadt, Germany

4.3 Métodos

4.3.1 Difusão em Ágar

As amostras foram submetidas à avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar pelo método do poço, contra a cepa supracitada.

Foi reativado o micro-organismo estocado na bacterioteca em meio de cultura ágar BHI, vertendo aproximadamente 20 ml em placa de Petri até atingir uma altura de 5 mm, utilizando a técnica de semeadura por estrias de esgotamento, incubando-a por 18 horas a 37°C em Estufa Bacteriológica TE-392/2, Tecnal (Piracicaba – SP) (KONEMAN et al., 2001).

A cepa de colônias isoladas da bactéria foi semeada em caldo BHI e incubada a 37°C por 18 horas. Após esse período, o inóculo foi padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland utilizando o espectrofotômetro Biomate 3 (Thermo Electron Corporation) com esse fim, calibrando o aparelho no modo de crescimento de bactérias a um comprimento de onda de 580 nm. A amostra de meio de cultivo estéril de caldo BHI, que não foi inoculada, foi colocada em uma cubeta para leitura de sua densidade óptica e serviu de referência para determinar o “branco”. Em seguida foi feita a leitura do inóculo no espectrofotômetro, que mostrou crescimento bacteriano evidenciado pela sua maior turbidez em relação ao meio de cultura que não foi inoculado. A fim de padronizar para aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml, que corresponde à escala 0,5 de McFarland, o inóculo foi diluído com caldo BHI estéril até apresentar leitura no espectrofotômetro entre 0,08 e 0,1 de transmitância (KONEMAN et al., 2001).

Preparou-se ágar Müeller-Hinton (Difco), que foi distribuído em placas de Petri de 150 mm de diâmetro, com volume suficiente para atingir uma espessura de 5 mm. Após a solidificação e por meio da técnica de semeadura de superfície, a suspensão microbiana foi inoculada em cada placa, com auxílio do suabe, em três sentidos: horizontal, vertical e diagonal, para evitar o crescimento de colônias isoladas.

Para permitir a difusão adequada das pastas no ágar, as substâncias foram divididas em duas placas, de maneira que em ambas sempre havia o controle positivo correspondente a clorexidina em gel (CHX) a 2 % e o controle negativo que era o Polietileno glicol (PEG) 400, a fim de verificar a viabilidade das bactérias. No experimento “A” (Quadro 1) estavam presentes a pasta de PEG 400 + $\text{Ca}(\text{OH})_2$; o extrato glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB); a pasta de EGB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e os controles. No experimento “B” (Quadro 2) estavam presentes a pasta de PEG 400 + óxido de zinco (ZnO); a pasta de PEG 400 + ZnO + $\text{Ca}(\text{OH})_2$; a pasta de EGB + ZnO; a pasta de EGB + ZnO + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e os controles.

Foram confeccionados poços no ágar utilizando-se pontas de pipeta 1000 µl, previamente autoclavadas, de forma a padronizar o diâmetro da perfuração em 8 mm, sendo confeccionados 5 poços equidistantes em cada placa de Petri para o experimento “A” e 6 para o experimento “B”.

O proporcionamento entre os pós e o veículo das pastas foi dado conforme os pesos constatados para que a viscosidade fosse equivalente a de dentifrício, o que é clinicamente indicado, utilizando-se como referência sempre 70 µl de veículo, seja Polietileno glicol 400 (PEG 400), seja extrato glicólico de *Musa paradisiaca* (Quadro 1 e Quadro 2). Para determinar a correta relação pó/veículo para a viscosidade desejada, foi pesado primeiramente 1 g de pó e colocado sobre a placa de vidro juntamente com os 70 µl de veículo. A espatulação foi realizada de maneira a adicionar aos poucos pequenas porções do pó ao veículo até ser obtida a viscosidade desejada para uso clínico. O valor que foi utilizado foi obtido subtraindo-se de 1 g o peso de pó restante na placa depois de finalizada a espatulação (FALCÃO, 2010).

Quadro 1

Composição das amostras de cada grupo a ser testado no experimento “A”

1 - PEG 400 – controle negativo	70 µl
2 - PEG 400 + Ca(OH) ₂	70 µl + 0,062 µg
3 - Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i> - EGB	70 µl
4 - EGB + Ca(OH) ₂	70 µl + 0,082 µg
5 - Clorexidina gel (2%) – controle positivo	70 µl

Quadro 2

Composição das amostras de cada grupo a ser testado no experimento “B”

1 - PEG 400 – controle negativo	70 µl
2 - PEG 400 + óxido de zinco	70 µl + 0,120 µg
3 - PEG 400 + óxido de zinco + Ca(OH) ₂	70 µl + 0,043 µg
4 - EGB + óxido de zinco	70 µl + 0,126 µg
5 - EGB + óxido de zinco + Ca(OH) ₂	70 µl + 0,076 µg
6 - Clorexidina gel (2%) – controle positivo	70 µl

A espatulação das pastas foi realizada com o uso das placas de vidro estéreis e das espátulas nº 24 esterilizadas, dentro da capela de fluxo laminar, de forma que as quantidades de hidróxido de cálcio e de óxido de zinco fossem pesadas previamente na balança de precisão MARTE e acondicionadas em microtubos, mantendo as devidas proporções. Dessa maneira, a viscosidade da pasta obtida foi de acordo com seu uso clínico. Na sequência, foram espatuladas pastas com o veículo de Polietileno glicol 400 com hidróxido de cálcio, com óxido de zinco e, por último, com a associação dos dois. Em seguida, as mesmas composições foram repetidas, com a quantidade de cada pó diferente da usada para o Polietileno glicol 400, para adequar a viscosidade desejada quando o veículo utilizado fosse o Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB).

Posteriormente, foram colocadas em cada um dos poços, confeccionados nas placas de Petri devidamente identificadas, as amostras que seriam testadas, o EGB, o gel de clorexidina a 2% (controle positivo) e o Polietileno glicol 400 (controle negativo), com o auxílio de palitos previamente esterilizados, em quantidade suficiente para que todas as paredes circundantes do poço fiquem totalmente em contato com as substâncias testadas.

As placas de Petri foram seladas com filme PVC e mantidas à temperatura ambiente por 2 horas, para que ocorresse a pré-difusão das substâncias e, então, foram incubadas a 37°C, por 18 horas. Todos os experimentos foram repetidos 5 vezes.

Os halos de inibição do crescimento microbiano que se formaram no ágar foram medidos depois de transcorrido o período de incubação de 18 horas para cada micro-organismo. As leituras foram realizadas com auxílio de uma régua milimetrada, para determinação do diâmetro (em milímetros) dos halos de inibição. As medidas foram tomadas tendo-se dois pontos de referência: a distância entre os pontos que delimitava a área de inibição de crescimento microbiano e o início da região de seu crescimento, presente ao redor dos poços que continham as respectivas amostras. O valor de 8 mm foi utilizado como valor de corte, correspondente ao tamanho dos poços confeccionados.

4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Macrodiluição

A pasta que obteve halos de inibição de crescimento microbiano foi testada quanto à concentração inibitória mínima pelo método da macrodiluição. O micro-organismo referido foi cultivado em tubo de ensaio com 5 ml de caldo de cérebro-coração (BHI), esterilizado previamente, posicionando-o em uma angulação de aproximadamente 15° para que houvesse formação de um bisel na superfície do meio em contato com o ar, maximizando sua aeração,

durante 18 horas a 37°C, em incubadora com agitação orbital MARCONI MA 410/CF a 150 rpm, respeitando as devidas características respiratórias da cepa (KONEMAN et al., 2001).

Em novo tubo de ensaio com caldo Müeller-Hinton (MHB) estéril foi padronizada a cultura de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A pasta foi preparada seguindo o mesmo protocolo a que foi submetida para o teste de difusão em ágar. A pasta foi diluída em 5 ml do respectivo meio estéril, homogeneizada usando vórtex durante 1 minuto.

Foram realizadas diluições seriadas na razão de 10, retirava-se 0,5 ml do tubo 1 e acrescentava-se em 4,5 ml de meio MHB do tubo 2 e, assim, sucessivamente. Para o repique utilizou-se 0,1 ml do meio cultivado, em cada um dos tubos, a cada etapa (Figura 6). As soluções dentro dos tubos foram dispostas em bisel, em incubadora com agitação orbital MARCONI MA 410/CF a 150 rpm, a 37°C, durante 18 horas.

Foram utilizados três controles, o primeiro controle correspondia à diluição da pasta no meio de cultura sem alíquota do inóculo, para verificar se a turbidez da mesma interferiria na leitura do espectrofotômetro; o segundo era o negativo, um tubo de ensaio apenas com o meio estéril utilizado – averiguando se haveria manutenção da cadeia asséptica; finalizando com o positivo que continha o meio utilizado e 0,1 ml de meio cultivado – que testou a viabilidade do micro-organismo. Uma amostra do controle negativo foi analisada no espectrofotômetro antes de ser incubada para comparar com outra amostra do mesmo tubo depois da incubação, sendo que essa leitura foi considerada o valor correspondente ao “branco”, que provava o não crescimento da bactéria (Figura 6).

poderia se observar caso a turbidez referente à pasta interferiria ou não. A verificação foi realizada colhendo uma alíquota desse tubo sem agitá-lo e comparando-a com a leitura do controle negativo. Caso a leitura fosse igual ao “branco” entender-se-ia que não houve interferência, caso contrário, se fosse maior que o “branco” correspondia à interferência na turbidez.

Levando em consideração que não aconteceu a interferência, puderam-se avaliar as alíquotas colhidas de cada tubo, sem agitá-los, correspondente às diversas diluições por meio da leitura obtida pelo espectrofotômetro. Caso a leitura fosse igual ao “branco” correspondia ao não crescimento microbiano, mas se fosse maior mostrava o crescimento microbiano.

Caso acontecesse interferência da pasta na turbidez, todos os tubos seriam homogeneizados por 1 min no vórtex para que depois uma alíquota de 0,2 ml de cada diluição fosse colhida e plaqueada em meio ágar LB, incubadas por 18 h a 37°C. Após esse período seriam contadas as UFCs evidenciando a presença da bactéria ou não.

A menor concentração da amostra que impedisse o crescimento microbiano seria considerada a concentração inibitória mínima (CIM). Os testes foram feitos em duplicata (KONEMAN et al., 2001).

4.3.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray- ESI-MS

O extrato glicólico de *Musa paradisiaca*, por ser de origem natural, provavelmente possui características heterogêneas caracterizando-se como uma mistura complexa de moléculas orgânicas. No intuito de esclarecer melhor quais seriam os princípios ativos que poderiam representar a atividade antimicrobiana testada procurou-se usar técnicas que pudessem separá-los e identificá-los.

A análise do EGB por espectrometria de massas (EM) foi realizada com a equipe do Prof Dr Afonso Duarte Leão de Souza do Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas. A EM pode ser considerada o sistema analítico de medida mais sensível existente, já que ele tem a capacidade de pesar moléculas. Isso o torna de extrema relevância nas Ciências Biológicas, tendo a capacidade de analisar misturas de moléculas orgânicas complexas, principalmente devido a técnicas de ionização agora existentes, como a de Electrospray (ESI). O espectrômetro de massas determina a massa da molécula medindo sua razão massa/carga (m/z). Quatro componentes básicos são, na maioria das vezes, padrão dos espectrômetros de massas (Figura 7). Após a introdução da amostra, íons são gerados induzindo tanto a perda quanto o ganho de carga elétrica a partir de uma espécie neutra. Uma vez formados, os íons são eletrostaticamente direcionados a um analisador de massa (“balança molecular”), onde são separados de acordo com a relação m/z e finalmente são detectados.

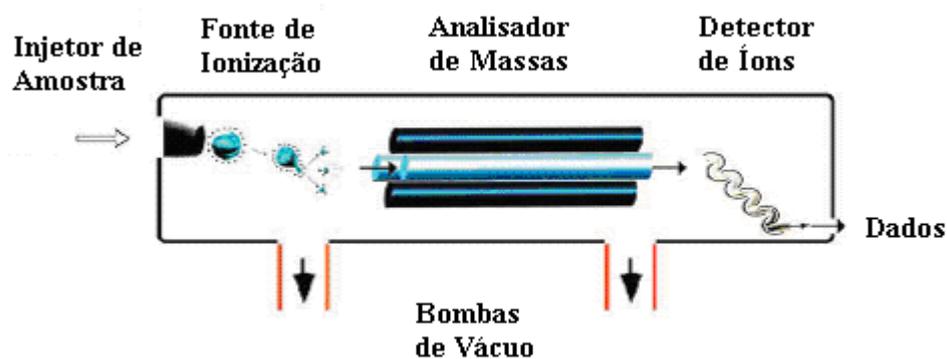


Figura 7. Componentes de um Espectrômetro de Massas.
Fonte: Araújo (2005)

Essa metodologia foi muito bem descrita por John B. Fenn que em 2002 ganhou um prêmio Nobel e foi o pioneiro na utilização de ESI, assim sendo em suas palavras:

A arte de medir átomos e moléculas para determinar seus pesos moleculares. Esta informação de massa ou peso é às vezes suficiente, frequentemente

necessária e sempre útil na determinação da identidade e estrutura da espécie. Para realizar esta arte, é adicionada carga na amostra (analito) de interesse, então é medida como a trajetória do íon resultante responde, no vácuo, sob várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Sendo assim a condição elementar para este método é a transformação de moléculas neutras em íons. A ionização para moléculas de baixo peso molecular é rapidamente efetuada pelo encontro em fase gasosa destas moléculas neutras com elétrons, fótons ou outros íons. Nos últimos anos, os esforços de vários pesquisadores têm sido em produzir íons de espécies de alto peso molecular (>1000 ua) e complexas para serem evaporadas sem que haja sua decomposição. (ARAÚJO, 2005, p. 1).

Essa técnica pode ser entendida quando comparada a uma célula eletrolítica, sendo que o capilar metálico ou um fio metálico em contato com a solução é o eletrodo de trabalho com capacidade de alterar o sistema químico inicial onde podem ocorrer reações para esse fim, enquanto que o segundo eletrodo está normalmente aterrado e é denominado contra-eletrodo (Figura 8). A passagem de moléculas em solução paulatinamente para a fase gasosa rege a técnica possibilitando a análise inclusive de polipeptídeos sem ocorrer sua degradação. Aplicando uma fonte de alta tensão (1 a 7 Kv) à solução, bombeia-se a mesma através de um microcapilar a uma velocidade que pode variar entre 1 a 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na extremidade do capilar pode-se verificar a concentração de íons que estão sendo repelidos pelo potencial aplicado, caso o potencial for positivo os íons também serão positivos. O contra-eletrodo provoca a deformação da gota na extremidade conforme a densidade iônica aumenta, formando o cone de Taylor (Figura 8 - A). No momento que a força de repulsão vence a tensão superficial da solução, pequenas gotas com alta densidade de carga são liberadas, ocorrendo transporte de íons intermitentemente pelo fato de parte deles estar na fase gasosa. A dessolvatação das gotas permite isso já que, logo após serem liberadas do cone de Taylor, o solvente evapora e perde sua massa pelo seu contato com um gás inerte secante, por exemplo o nitrogênio, tendo papel auxiliar neste processo a temperatura da câmara que varia entre 30°C e 100°C. Existe um incremento na carga das gotas causado pelo aumento de sua densidade após a evaporação e mais uma vez os íons vencem a tensão superficial das gotículas, processo chamado de

explosões de Coulomb (Figura 8 - B). Depois de formado, o íon alcança a região do cone de amostragem que tem um orifício bem pequeno de 1 μm . A partir daí o sistema passa para a região de baixa pressão. Na interface pressão atmosférica/vácuo, há um sistema de bombas e um conjunto de lentes ópticas, que conduzem os íons ao analisador de massas. Nesta fase pode ocorrer a dissociação ocorrida por colisão dos íons formados pelo electrospray com as moléculas do gás secante presente. O potencial aplicado para a aceleração dos íons solvatados promove esse choque físico, podendo perder moléculas do solvente. Dependendo da finalidade do estudo, esse processo pode ser interessante, como em estudos de dissociação. No entanto, dificulta a visualização da forma que espécies se encontram em solução (ARAÚJO, 2005).

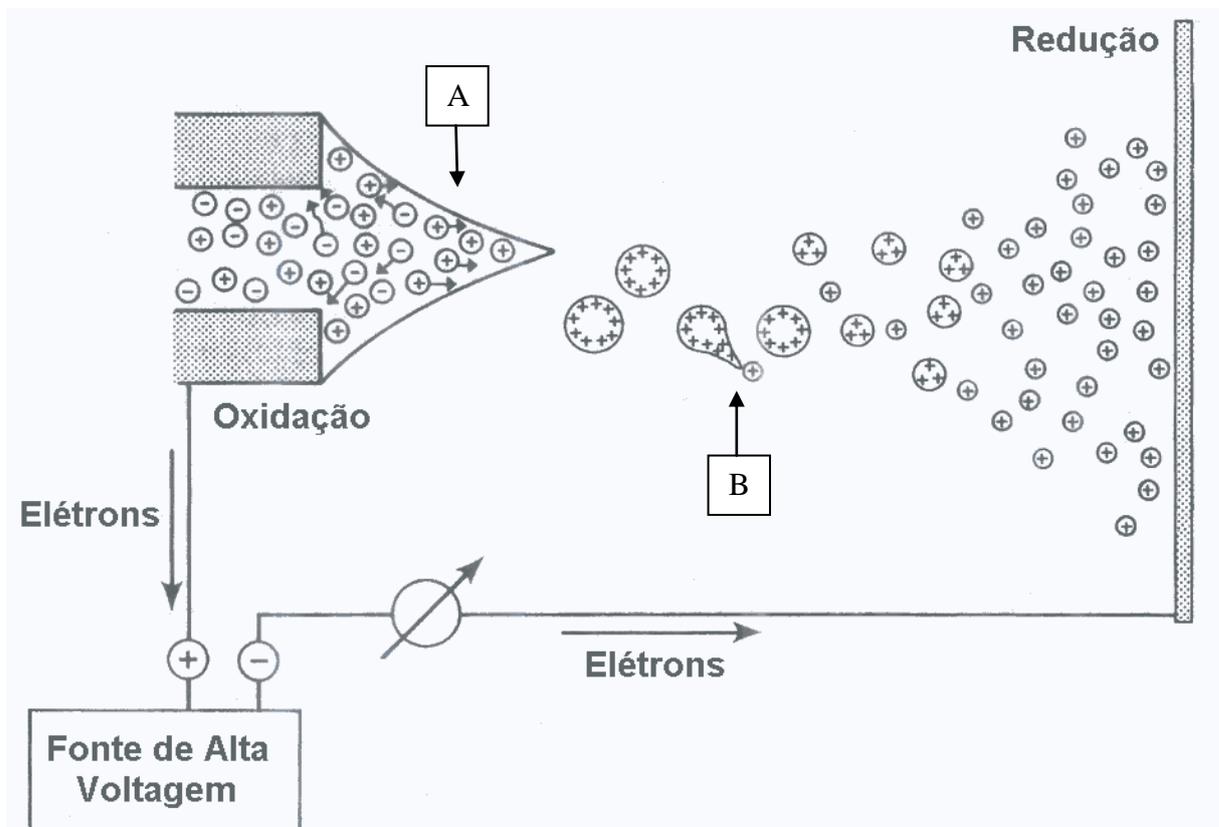


Figura 8. Processo de ionização por Electro spray; percebe-se a formação do cone de Taylor (A) e as explosões de Coulomb (B) nos detalhes da ilustração.

Fonte: Araújo (2005)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em espectrômetro de massas THERMO-LCO FLEET (Figura 9). Os espectros de massas foram obtidos por meio de inserção direta da amostra de EGB, mesmo sendo uma amostra de constituição complexa, no bico injetor dissolvido com metanol. Justificou-se pela provável presença de sítios ácidos e básicos nas moléculas detectadas como íons contendo somente uma carga, na sua forma protonada ou desprotonada.



Figura 9. (A) Espectrômetro de Massas e (B) Injetor da Amostra em detalhe.

4.3.4 Cromatografia em Camada Delgada

Esta etapa de nosso estudo foi realizada com a colaboração do laboratório de Bioprospecção do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA), consentido gentilmente pela Profa Dra Cecília Verônica Nunez.

Na tentativa de separar a mistura complexa do extrato, utilizou-se uma extração com solventes baseada na diferença da constante de distribuição dos componentes entre dois solventes de cada vez, fazendo sequencialmente uso de solventes com polaridades diferentes, para obter uma partição líquido/líquido.

A primeira etapa foi secar o extrato em uma capela, por 48 h. O extrato foi então diluído em água destilada na proporção 1:1. Utilizando um funil de separação colocou-se 250

ml da diluição obtida e acrescentou-se 250 ml de diclorometano, previamente filtrado. Agitou-se e, em seguida, permitiu-se o extravasamento do gás formado. Assim que as camadas distintas se separaram, colheu-se a camada correspondente à fase de diclorometano, de menor densidade do que a fase aquosa. Repetimos esse procedimento mais 2 vezes. Sob a fase aquosa que restou acrescentou-se 250 ml de acetato de etila, previamente filtrado. Procedendo equivalentemente ao processo anterior, agitou-se e liberou-se o gás (nesta etapa não ocorre muita liberação), aguardou-se a separação das fases distintas e recolheu-se a fase de acetato de etila, depois foram realizadas mais 2 repetições do processo. Dessa maneira tivemos três fases distintas uma correspondente à água de maior polaridade, uma correspondente ao diclorometano de polaridade intermediária e a terceira de acetato de etila de menor polaridade. As três fases foram colocadas na estufa 35 °C durante 10 dias para que secassem e ficassem concentradas.

Obtidas essas diferentes fases, poder-se-ia separar individualmente os diversos constituintes do extrato na tentativa de identificá-los por cromatografia de camada delgada (CCD). Tal separação era dada por meio da migração da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel). Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e viajam mais lentamente que a fase móvel devido ao efeito retardante da fase estacionária. O equilíbrio de distribuição determina a velocidade com a qual cada componente migra através do sistema.

Na CCD foi utilizada para cada fase líquida obtida uma fase móvel que possibilitaria a eluição dos componentes presentes na mesma, levando-se em consideração a natureza da amostra e a polaridade da fase móvel, já que as moléculas desta competem com as da amostra pela superfície adsorvente da fase estacionária. Para a fase de diclorometano utilizou-se a mistura de hexano/acetona na proporção 7:3; para a fase de acetato de etila utilizou-se

diclorometano/acetona na proporção 1:1; na fase aquosa utilizou-se acetona/metanol na razão de 2:8.

Cromatoplasmas pré-fabricadas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) de fase normal com 0,2 mm de espessura compuseram a fase estacionária para todas as partições líquido/líquido, padronizaram-se tamanhos iguais de 5,5 cm por 1,5 cm. Suaves marcações foram feitas na parte superior e inferior da cromatoplasma distando 0,5 cm das bordas, servindo de parâmetro para o nível que deveria estar o eluente em sua base e até onde poderia se permitir que o mesmo eluísse, carregando os diversos componentes (Figura 10).

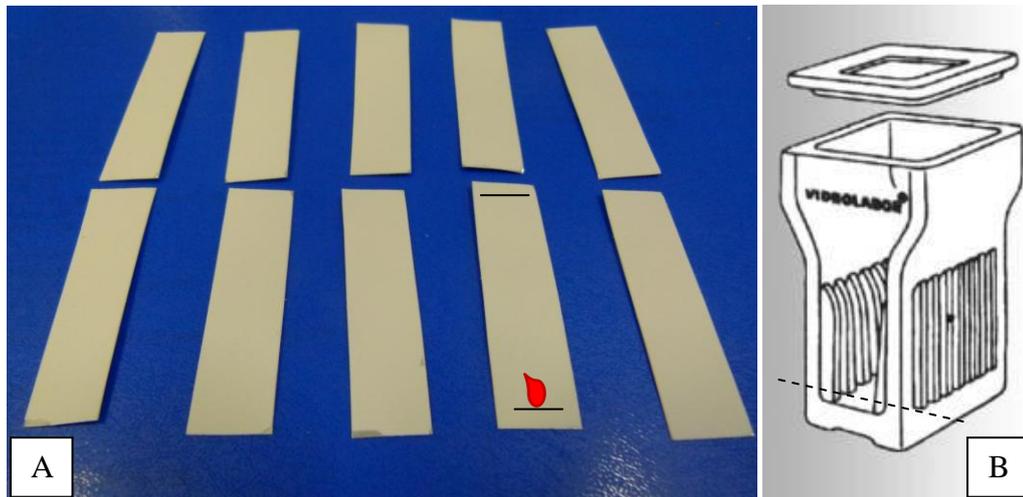


Figura 10. Cromatoplasmas de sílica (A); as marcações são realizadas na parte inferior para haver uma margem do nível que o solvente pode estar na cuba cromatográfica (B) e superior para ter a referência do ponto máximo de eluição do solvente. A alíquota da amostra é dispensada imediatamente acima da marcação inferior no centro da cromatoplasma como ilustrado em vermelho (A).

Fonte: (B) <http://www.casamoser.com.br/produtos_dois.htm>. Acesso em 8 de maio 2011.

Apenas o fundo da cuba cromatográfica foi preenchido com o eluente, de maneira que não ultrapassasse a marcação inferior da cromatoplasma quando esta fosse posicionada verticalmente dentro da cuba (Figura 10). Um filtro de papel (Whatman) foi disposto lateralmente dentro da cuba antes de posicionar a cromatoplasma, evitando interferência na volatilização do eluente na CCD.

Cada partição seca foi diluída com pequena alíquota de seu próprio solvente, de maneira que a fase aquosa fosse com água destilada, a fase de diclorometano com ele mesmo, e a de acetato de etila também com o próprio. Utilizou-se um capilar de vidro e colocou-se uma gota de cada partição, em posição central e inferior (que estivesse acima da marcação previamente feita), na cromatoplaça e aguardou-se evaporar o solvente (Figura 10). Enfim, posicionou-se a cromatoplaça verticalmente dentro da cuba com seu eluente correspondente, fechando a tampa da cuba e, aguardou-se o tempo de eluição que foi variável. As cromatoplaças foram retiradas apenas ao atingir, sem ultrapassar, a marcação superior. Aguardou-se a volatilização do solvente e procedeu-se a revelação da cromatoplaça.

Para cada revelador foi utilizada uma cromatoplaça e, além disso, foi realizada a análise visual por observação da cromatoplaça sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm e a 365 nm. Os reveladores utilizados foram cloreto férrico, anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico, cloreto de alumínio e Dragendorff.

Cloreto férrico e Dragendorff foram aplicados por aerossol sobre as respectivas cromatoplaças e aguardou-se a revelação depois de 5 min. Para a revelação do Cloreto de alumínio foi observada a cromatoplaça antes sob a luz UV de 365 nm e após a aplicação de seu aerossol, aguardou-se 5 min e observou-se novamente sob luz UV de 365 nm, avaliavam-se as diferenças da fotografia anterior e posterior. Tanto para o sulfato cérico quanto para o anisaldeído sulfúrico, depois de borrifados, aqueciam-se as cromatoplaças em uma manta de aquecimento a 100 °C até que fosse observada a revelação dos componentes.

Em adição a esta etapa foi enviada amostra do EGB ao Centro de Biotecnologia do Amazonas (CBA) para realizar também a CCD. A existência de equipamentos específicos, principalmente para a secagem da amostra (“speed-vac”), no CBA determinou a tomada desta decisão de solicitar seu laudo técnico.

4.3.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear - RMN

A Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear foi realizada. Também conhecida como a “cromatografia de spins”, baseada na metodologia dos ecos de “spin” com gradientes de campos magnéticos pulsados, permitiria discriminar e caracterizar os diversos componentes do EGB, procurando-se separar os sinais de Ressonância Magnética (RMN) de diferentes espécies de acordo com seus coeficientes de difusão. Uma das principais vantagens dessa técnica é a possibilidade de se avaliar substâncias em solução, que é um meio bem semelhante ao que as macromoléculas apresentam sua bioatividade (SOUZA; LAVERDE-JR, 2002; LAVERDE-JR, 2001).

A análise das três fases obtidas pela partição líquido/líquido foi realizada com a colaboração do laboratório de Bioprospecção do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA), consentido gentilmente pela Profa Dra Cecília Verônica Nunez. O espectrômetro trabalhou a 60 MHz para ^1H , tendo como referência a água deutérica (D_2O), o programa de processamento de dados do espectrômetro determinou os picos de todos os sinais que eram selecionados para análise, em que cada pico apresentava um decaimento exponencial específico.

4.4 Análise de Dados

A análise de dados foi realizada por meio de Estatística Descritiva. Entre a comparação das médias foi aplicado o teste de Mann-Whitney e, para a relação entre os escores, o coeficiente de correlação de Pearson foi o mais apropriado. Nas variáveis qualitativas se utilizou o teste Exato de Fisher e o cálculo do *odds ratio*. Para as conclusões foi utilizado o nível de significância de 5%. Os dados foram computados e analisados no Programa SPSS, versão 16.0 e R.2.11

5. RESULTADOS

5.1 Teste de Difusão em Ágar

No experimento “A”, não houve formação de nenhum halo de inibição, exceto o do controle positivo. A seguir representado na Figura 11, exemplifica-se um dos resultados.

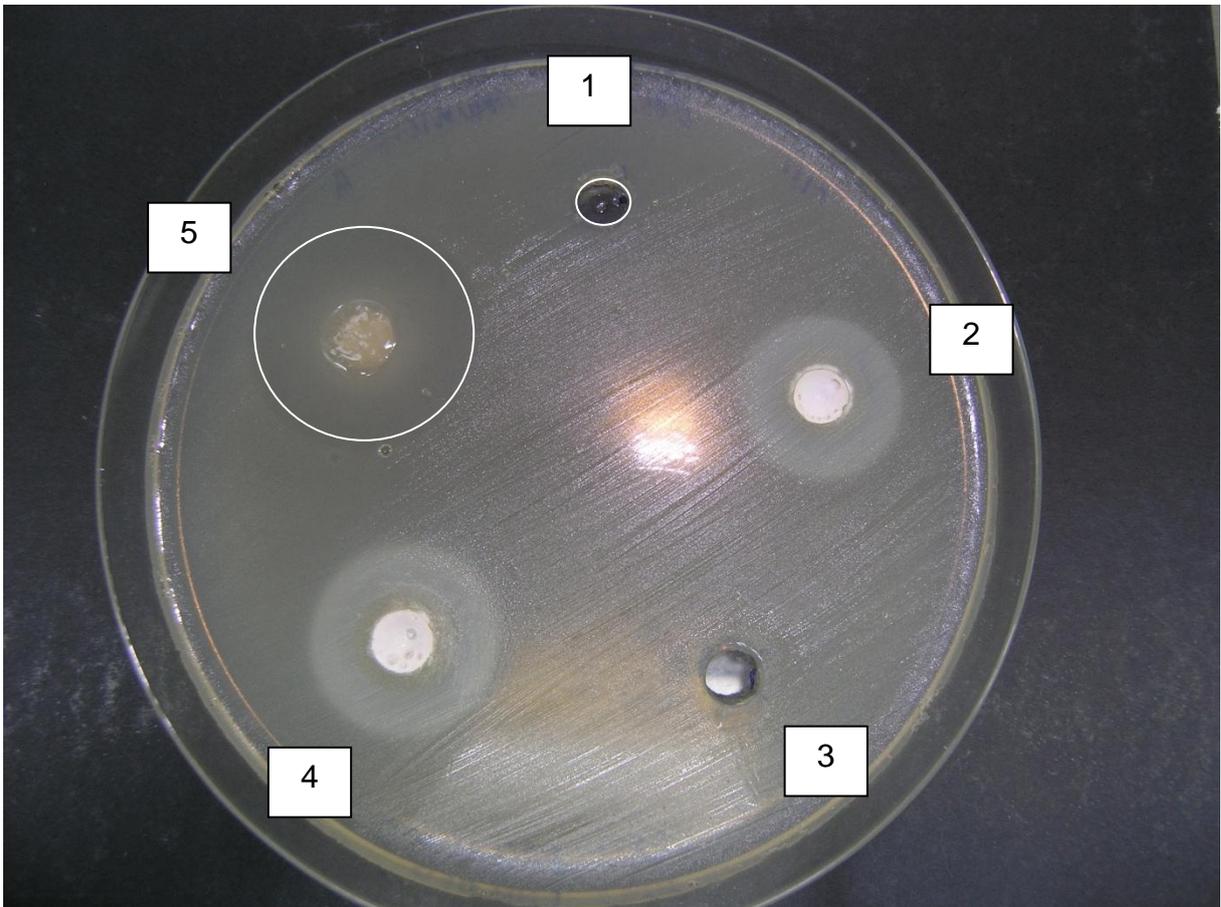


Figura 11. Experimento “A”; iniciando do topo, no sentido horário: 1 - PEG 400, 2 - PEG 400 + $\text{Ca}(\text{OH})_2$; 3 - EGB; 4 - EGB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$; 5 - CHX. Ressalta-se o diâmetro do poço 8 mm em 1. Em 5 observa-se o halo obtido pelo controle positivo.

Ainda analisando os resultados de “A”, pode-se verificar a inibição do crescimento

bacteriano em relação ao EGB quando o mesmo era avaliado sozinho, no entanto, percebeu-se a presença de algumas colônias bacterianas resistentes que ainda conseguiram crescer próximo ao limite do poço, não podendo considerar a formação do halo por este motivo. Esclarece-se melhor com a avaliação da Figura 12 a seguir.

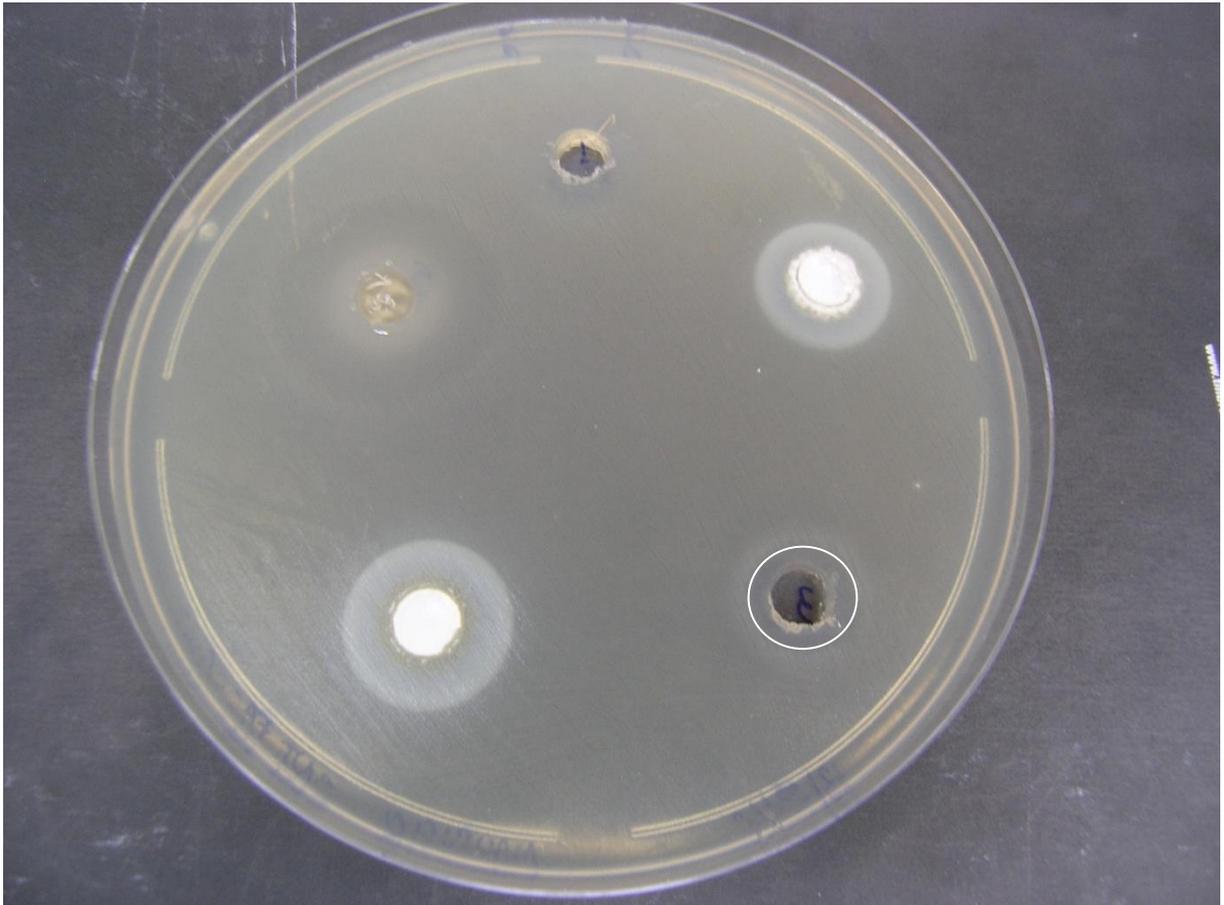


Figura 12. Detalhe do Experimento “A”; EGB promoveu grande inibição do tapete de colônias bacterianas, mas existia a presença de colônias de bactérias resistentes próximos ao limite do poço.

No experimento “B” pode-se verificar a formação de halo nas cinco repetições quando a pasta era composta por ZnO + EGB ou pelo controle positivo CHX. Em apenas duas repetições pode-se observar a formação de halo em menor proporção pela pasta de ZnO + PEG 400. Nas outras composições não houve formação de halo de inibição. Exemplifica-se na Figura 13, a seguir, estes resultados.

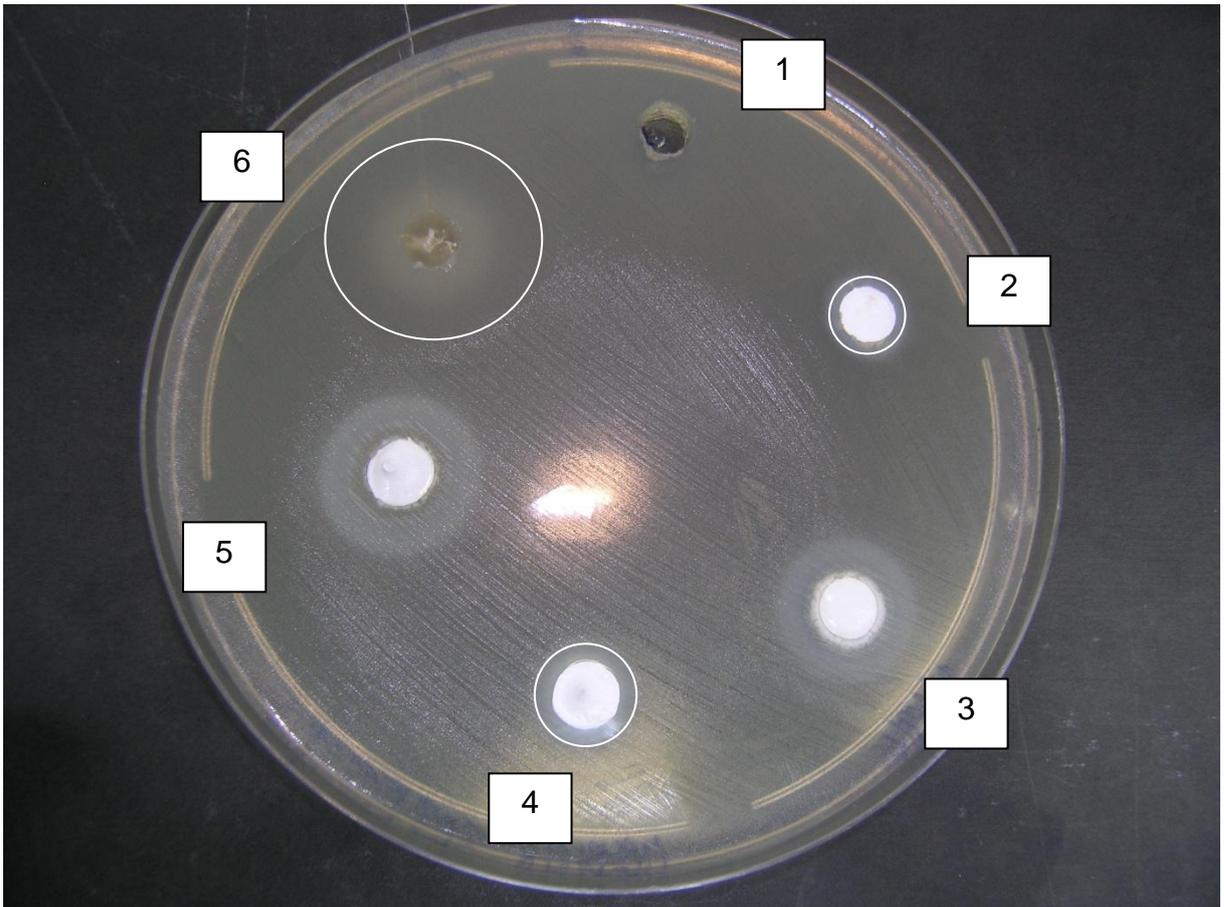


Figura 13. Experimento “B”; iniciando do topo, no sentido horário: 1 – PEG 400, 2 – PEG 400 + ZnO, 3 – PEG 400 + ZnO + Ca(OH)₂, 4 - EGB + ZnO, 5 - EGB + ZnO + Ca(OH)₂, 6 – CHX. Nas 5 repetições formaram-se os halos para CHX e ZnO + EGB, apenas em 2 repetições houve pequena inibição de PEG 400 + ZnO.

Os resultados detalhados estão descritos no Apêndice 1, informando quais foram os resultados obtidos dos diâmetros em milímetros dos halos de inibição de cada experimento. Os resultados do teste de difusão em ágar estão dispostos graficamente na Figura 14 apresentada a seguir.

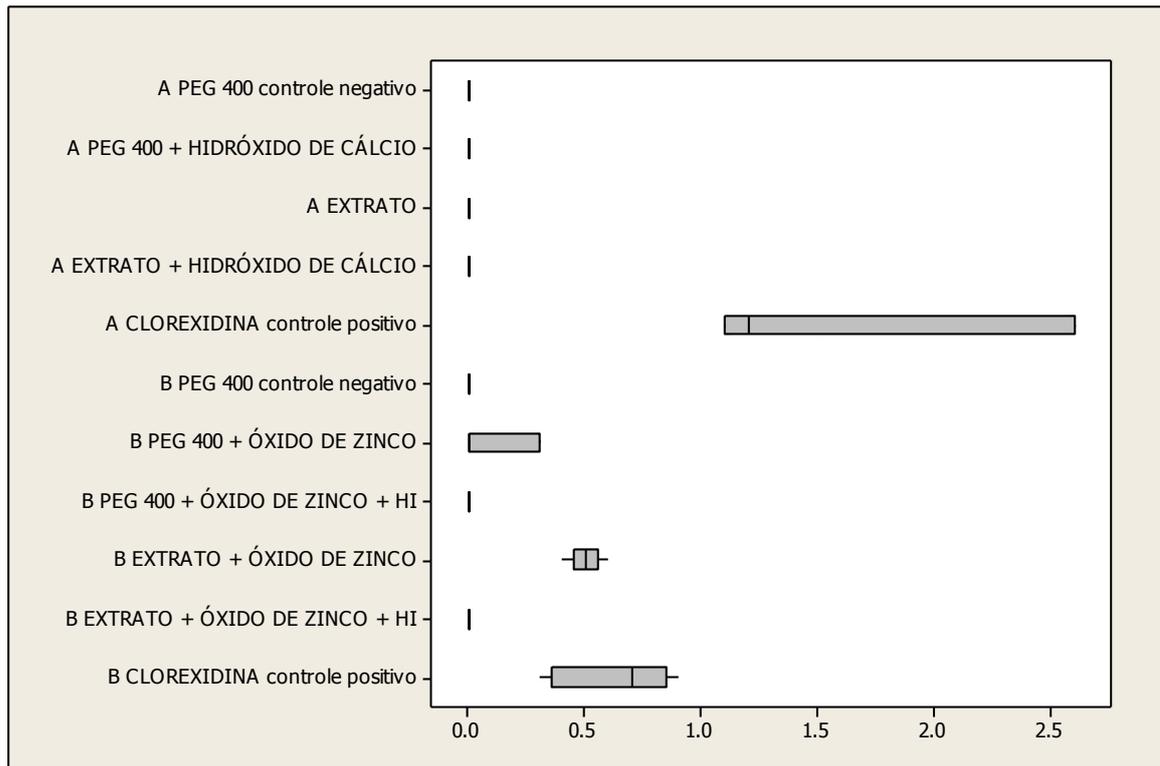


Figura 14. Variação dos halos de inibição em milímetros obtidos para as respectivas pastas nos experimentos “A” e “B”, repetidos 5 vezes.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico e estão representados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Valores dos dados estatísticos obtidos dos valores dos halos de inibição

TRATAMENTO		n	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
A	PEG 400 controle negativo	5	0	0	0	0	0
	PEG 400 + Ca(OH) ₂	5	0	0	0	0	0
	EXTRATO	5	0	0	0	0	0
	EXTRATO + Ca(OH) ₂	5	0	0	0	0	0
	CLOREXIDINA controle positivo	5	1,720	0,804	1,2	1,1	2,6
B	PEG 400 controle negativo	5	0	0	0	0	0
	PEG 400 + ZnO	5	0,12	0,1643	0	0	0,3
	PEG 400 + ZnO + Ca(OH) ₂	5	0	0	0	0	0
	EXTRATO + ZnO	5	0,5	0,0707	0,5	0,4	0,6
	EXTRATO + ZnO + Ca(OH) ₂	5	0	0	0	0	0
	CLOREXIDINA controle positivo	5	0,62	0,259	0,7	0,3	0,9

A atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* que estatisticamente teve relevância foi a da pasta de ZnO e EGB. Os valores desta pasta foram estatisticamente semelhantes ao de CHX, que era o controle positivo, com $p = 0,596$. Os valores referentes à pasta de PEG 400 e ZnO foram estatisticamente diferentes de CHX, $p = 0,018$, que era o controle positivo e também diferentes da pasta de Zno e EGB, $p = 0,01$ (Tabela 2).

Tabela 2

Comparativo dos testes difusão em ágar dos experimentos não nulos.

Comparação		<i>p</i>
PEG 400 + ZnO	EGB + ZnO	0,01*
	CHX (controle positivo “B”)	0,018*
EGB + ZnO	CHX (controle positivo “B”)	0,596

Teste de Mann-Whitney

5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Macrodiluição

Foi feito o teste de CIM apenas para a pasta de ZnO e EGB. Observou-se que os valores de transmitância de controle negativo e do controle com a pasta dissolvida no meio eram os mesmos depois da incubação, sem fazer agitação do tubo. Portanto, colheram-se as alíquotas para serem observados os valores de transmitância das diluições realizadas, evidenciando o crescimento bacteriano ou não. Os valores detalhados estão dispostos no Apêndice 2. A seguir ilustra-se um dos resultados do teste na Figura 15.



Figura 15. Concentração Inibitória Mínima; do lado esquerdo observa-se as diluições antes da incubação; do lado direito depois da incubação.

Não houve concentrações que pudessem inibir o crescimento bacteriano. Observou-se que existia uma variação nos valores da transmitância do espectrofotômetro que permitia uma pequena variação de crescimento bacteriano que foi um pouco menor na primeira e segunda diluição e aumentaram a partir da terceira diluição e com pequeno decréscimo na décima. Verifica-se graficamente a distribuição dos valores dos dois experimentos realizados “A” e “B” na Figura 16.

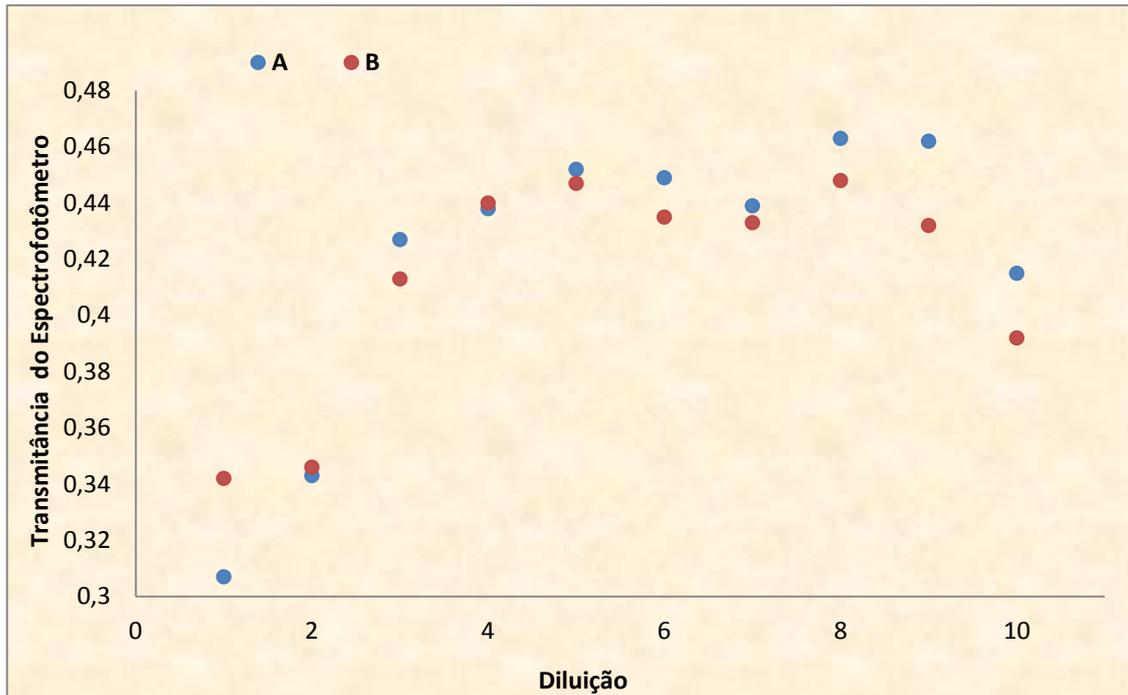


Figura 16. Gráfico de dispersão de valores de transmitância para cada diluição de 10^{-1} a 10^{-10} nos experimentos “A” e “B”. Observa-se que 0,3 corresponde a 30% de transmitância o que significa um alto grau de crescimento microbiano.

5.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

A aquisição de espectros no modo positivo é realizada por identificação de moléculas protonadas pela formação de adutos ligados a íons presentes em solução. A Figura Z refere-se ao espectro ESI(+)-MS em que há picos intensos de cátions na faixa de 203 a 723 m/z. Comparando com dados da literatura (ARAÚJO, 2005), foi possível a comparação de íons diagnósticos, entre eles, a presença de açúcares, oligômeros da maltose (Figura 17).

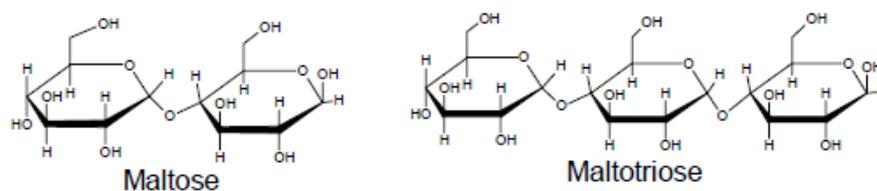


Figura 17. Oligômeros da maltose.
Fonte: Araújo (2005)

No espectro da Figura 18 o íon m/z 365 poderia se referir ao aduto de sódio $[M+Na^+]$ com maltose (ARAÚJO, 2005; OHLA et al., 2011) enquanto que o íon m/z 381 ao aduto de potássio $[M+K^+]$ também com a maltose e o íon m/z 543 de aduto de potássio com a maltotriose.

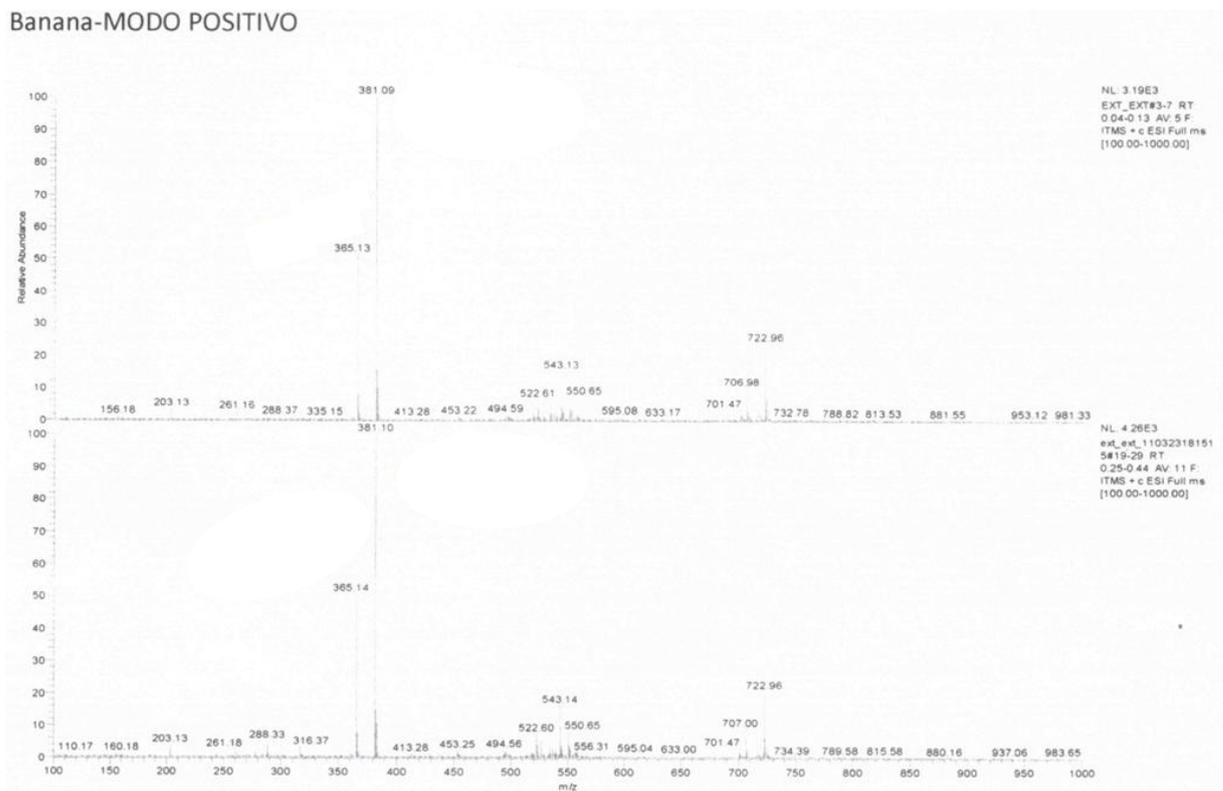


Figura 18. Espectrometria de Massas modo Positivo

Na obtenção de espectros de massa no modo negativo (Figura 19), há a observação dos adutos das substâncias com ânions presentes. Os ânions mais intensos aparecem na faixa de 133 e 790. O íon de m/z 341 poderia corresponder à forma desprotonada $[M-H]^-$ da maltose. Pode-se observar também ânion de m/z 377 que corresponderia ao aduto de cloreto com maltose. Outros picos característicos são os de m/z 255 e o 683, sendo que o íon de m/z 683 poderia se referir ao dímero de maltose desprotonada.

Banana-MODO NEGATIVO

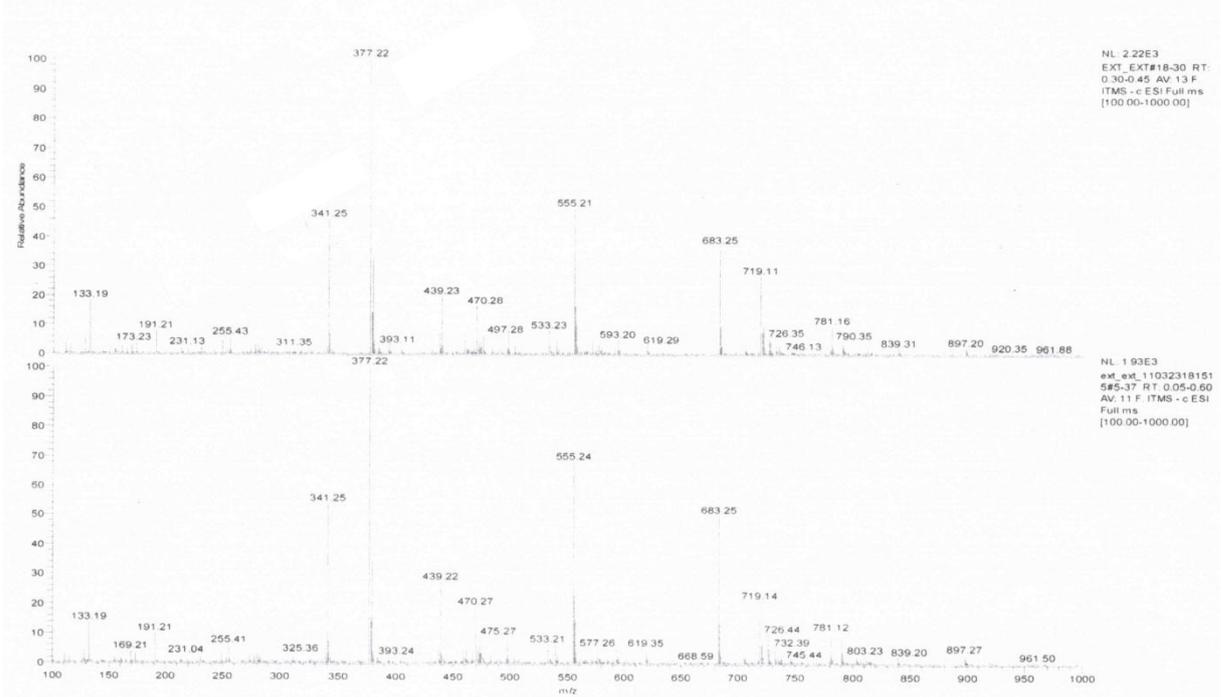


Figura 19. Espectrometria de Massas modo Negativo

Um pico muito intenso poderia indicar o ânion da glicose desprotonada de m/z 179. Distingue-se ainda o ânion 161 que se referiria à anidrohexitose desprotonada (Figura 20). Em ionização por electrospray a supressão iônica pode acontecer quando determinadas substâncias presentes na mesma gota são mais suscetíveis à ionização do que outras, como pode ser observado no caso da glicose em relação aos íons correspondentes aos oligossacarídeos.

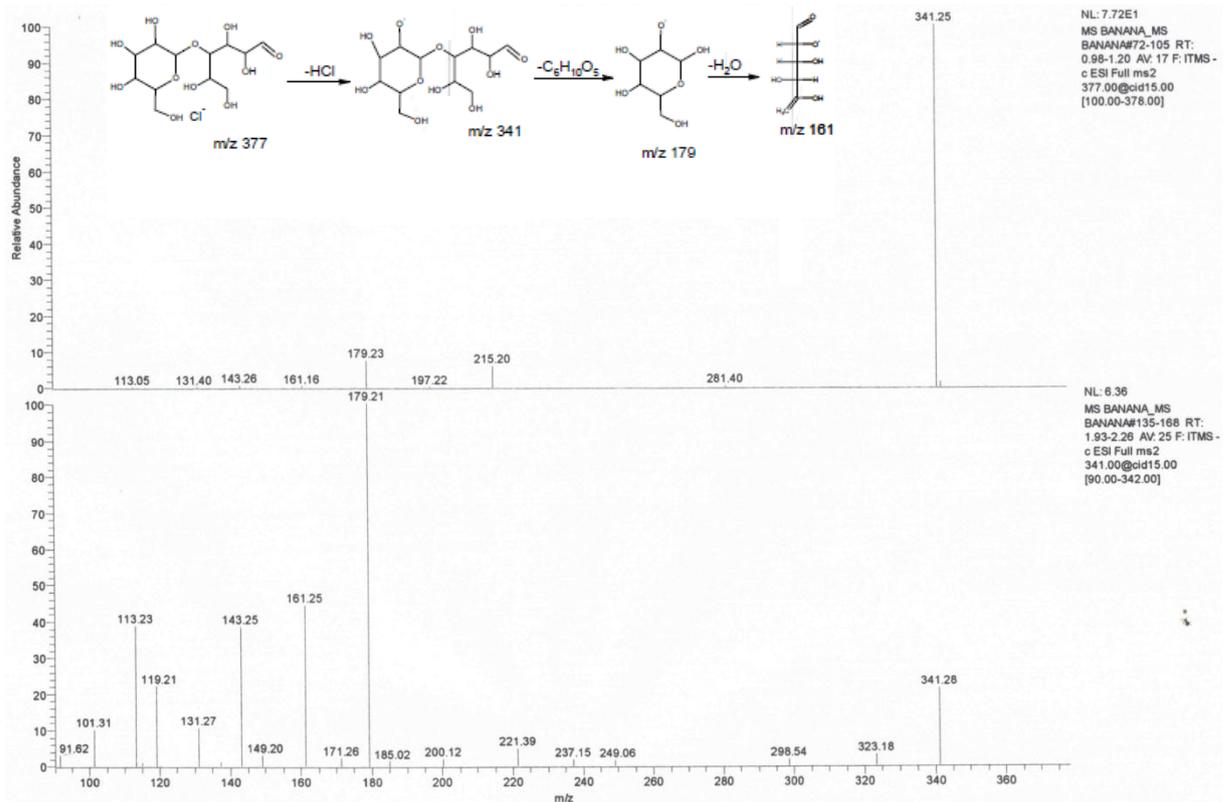


Figura 20. Espectrometria de Massas. O íon m/z 377 corresponde ao aduto de cloreto com maltose; o íon de m/z 341 corresponde à forma desprotonada da maltose; o íon m/z 179 refere-se a glicose desprotonada e o íon m/z 161 a anidrohexitose desprotonada.

5.4 Cromatografia por Camada Delgada - CCD

Na CCD fez-se algumas inferências a grupos de moléculas que estão presentes nas partições de diclorometano e aquosa. Na partição do acetato de etila não foi observada a presença de nenhuma molécula que fosse revelada pelos testes selecionados.

Por se tratar de um extrato glicólico, houve bastante dificuldade de se secar o material para se proceder aos testes propostos. Antes de fazer a partição líquido/líquido, apesar de o EGB permanecer por 48 h na capela para secagem, não houve nenhuma diferença no volume inicial e final (Figura 21).



Figura 21. Secagem do EGB na capela (à esquerda). Frasco com EGB para secagem dentro da capela.

Nessas condições a partição líquido/líquido foi feita já se sabendo da solubilidade do EGB em água (Anexo 1). Durante essa etapa pode-se notar que a partição de acetato de etila parecia não ter se alterado, como aconteceu com as outras duas (Figura 22).

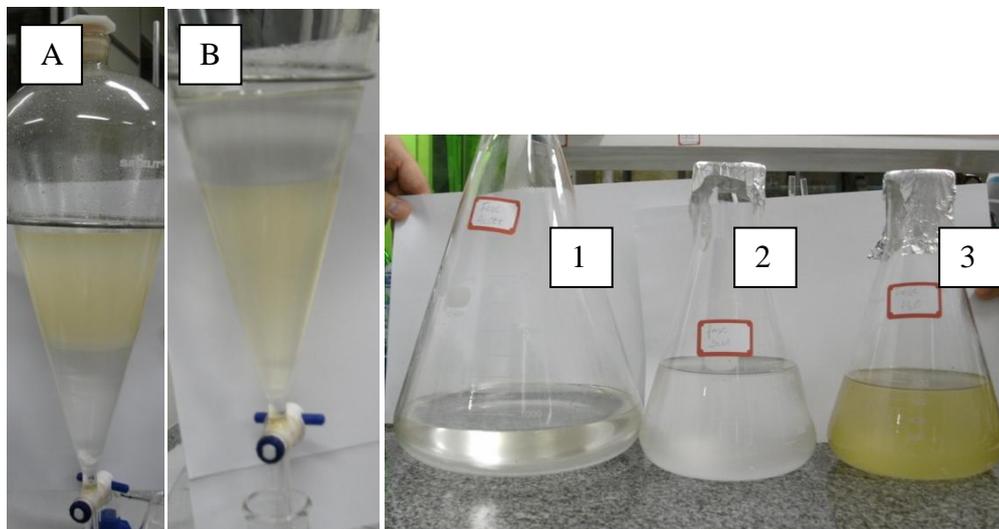


Figura 22. Partição líquido/líquido do EGB. À esquerda (A): fase diclorometano abaixo, fase aquosa acima; no centro (B): fase aquosa abaixo, fase de acetato de etila acima; à direita: (1) fase acetato de etila, (2) fase diclorometano e (3) fase aquosa.

Obtidas as três partições, elas permaneceram em estufa para secagem, no entanto, houve diferença no comportamento de secagem entre as partições. A partição de acetato de

etila secou completamente em pouco tempo, por volta de 6 h, comparada às outras duas fases, sem deixar nada aparentemente no frasco. A partição aquosa demorou 10 dias para secar deixando um resíduo escuro acastanhado no fundo do frasco. A partição de diclorometano não secou completamente, mesmo passados 10 dias, permanecendo uma fração pequena de um líquido claro amarelado (Figura 23).

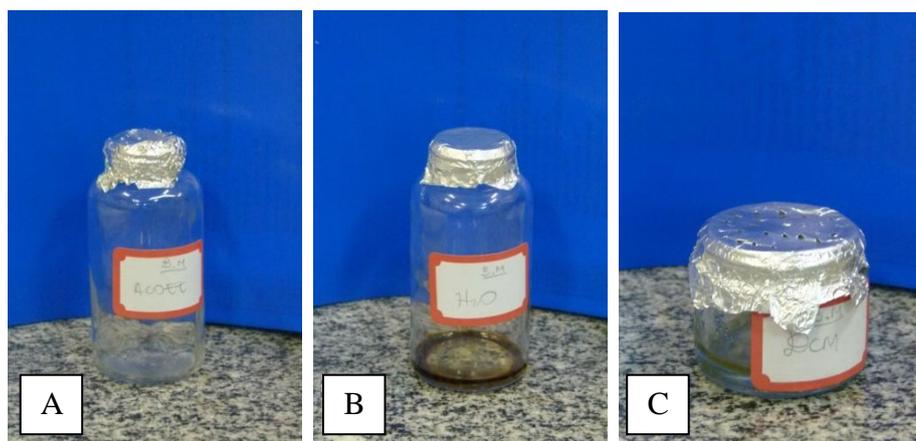


Figura 23. Fases depois de secagem na estufa; da esquerda para direita: (A) Fase Acetato de Etila, (B) Fase Aquosa, (C) Fase Diclorometano.

A partição de acetato de etila, não revelou nenhuma molécula pelos reagentes, que não fosse apenas na origem, o que pode representar apenas as moléculas do próprio solvente observadas à luz visível, UV 254nm e 365nm (Figura 24).

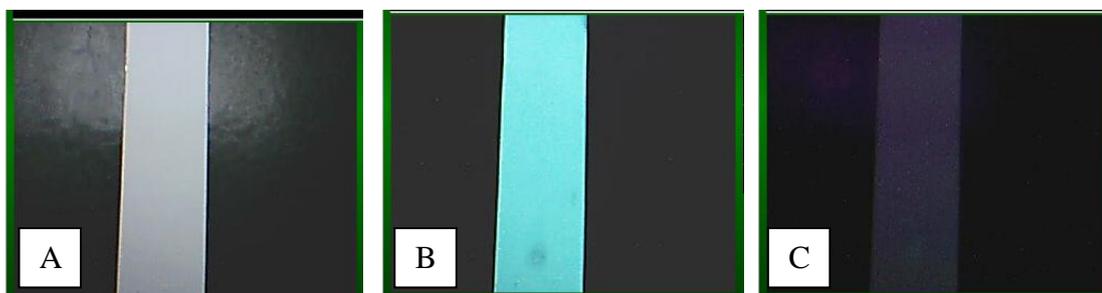


Figura 24. Análise da CCD da Fase de Acetato de Etila, da esquerda para direita: (A) à luz visível, (B) luz UV 254nm e (C) luz UV 365nm. Percebe-se um pequeno ponto apenas na origem.

A partição aquosa revelou alguns componentes que poderiam estar presentes no EGB. A luz visível e a UV 254nm mostraram Rf: 0,57. Para avaliar o revelador cloreto de alumínio é necessário comparar-se com a imagem antes de sua aplicação. Observa-se que houve uma intensificação na cor esverdeada fluorescente, como se a mesma tivesse ampliado, notando que sua parte central registrou novas áreas escuras, como se esta também tivesse aumentado (Rf: 0,57). A intensificação da área fluorescente e o aumento de sua amplitude indicam presença de flavonóides (WAGNER et al., 1984) (Figura 25).

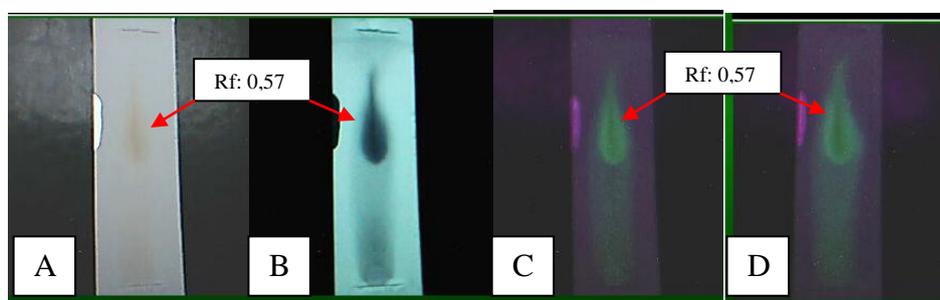


Figura 25. Análise da CCD da Fase Aquosa. Da esquerda para direita: (A) luz visível; (B) luz UV 254nm; (C) luz UV 365nm; (D) cloreto de alumínio observado à luz UV 365nm.

Observando o resultado da aplicação de outros reveladores, podemos verificar outros prováveis componentes. O anisaldeído sulfúrico revelou uma coloração marrom que indicaria a presença de um tipo de terpeno, um limonóide degradado (WESTERLON, 2006) ou taninos (Rf: 0,39). O sulfato cérico mostrou uma cor lilás (Rf: 0,39) que indicaria a presença de terpenos e nuances cinzas indicariam presença de flavonóides (WAGNER et al., 1984). Observa-se que nestas duas últimas revelações pode-se ter aquecido um pouco além do que o preconizado. A revelação para alcalóides não foi evidenciada com Dragendorff. O cloreto férrico apresentou uma cor mais escura (Rf: 0,57) que também poderia indicar taninos (WAGNER et al., 1984), as cores azul e vermelho não foram observadas, que indicariam a presença de fenóis (Figura 26).

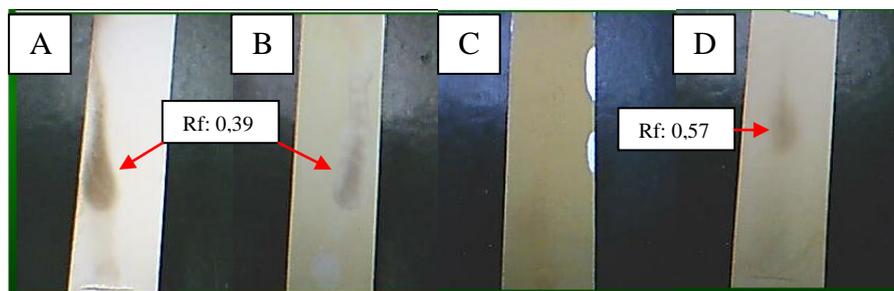


Figura 26. Análise da CCD da Fase Aquosa. Da esquerda para a direita: (A) anisaldeído sulfúrico; (B) sulfato cérico; (C) Dragendorff; (D) cloreto férrico.

A partição de diclorometano foi realizada sem necessidade de dissolver o resíduo com nenhum solvente adicional, pelo fato de o mesmo estar concentrado, mas ainda apresentava-se líquido, permitindo fazer a aplicação do material na origem da cromatoplaça para a eluição. A UV 254nm mostrou Rf: 0,07; 0,35; 0,78; 0,91 e a UV 365nm Rf: 0,07; 0,71; 0,91. O cloreto de alumínio mostrou uma diferença na coloração fluorescente da UV 365nm, Rf: 0,07 era mais esverdeada e Rf: 0,91 estava mais azulada, Rf: 0,78 e 0,71 não estavam evidenciadas enquanto que Rf:0,35 foi revelada. Verificou-se intensificação nas cores e nos tamanhos das manchas de forma que poderiam estar presentes flavonóides (Figura 27).

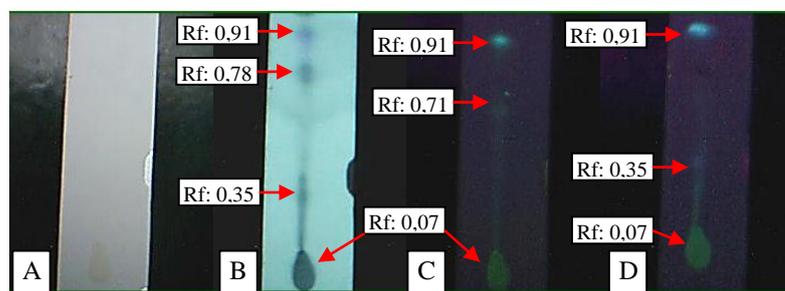


Figura 27. Análise da CCD da fase de Diclorometano, da esquerda para direita: (A) luz visível; (B) luz UV 254nm; (C) luz UV 365nm; (D) cloreto de alumínio observado à luz UV 365nm.

A seguir temos as revelações de anisaldeído sulfúrico com um discreto ponto lilás (Rf:

0,29) que poderia indicar a presença de esteróides (saponinas) e/ou triterpenos. O sulfato cérico também apresentou pequena mancha lilás (Rf: 0,43) que indicaria a presença de terpenos (WAGNER et al., 1984). Na revelação de Dragendorff percebe-se na origem uma mancha marrom clara circundada por uma coloração alaranjada (Rf: 0,13) que sugeriria a presença de alcalóides (WAGNER et al., 1984). A revelação de cloreto férrico foi negativa (Figura 28).

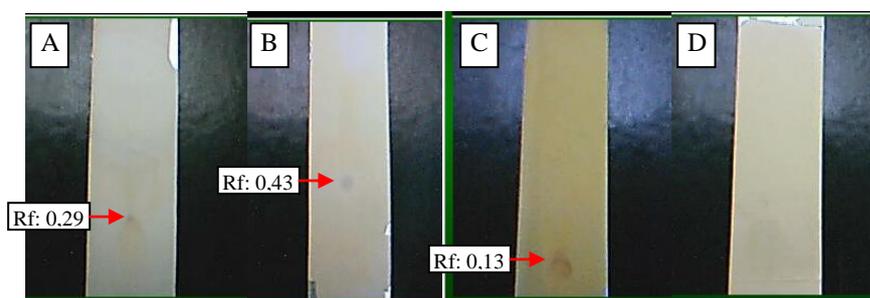


Figura 28. Análise da CCD da Fase de Diclorometano. Da esquerda para a direita: (A) anisaldeído sulfúrico; (B) sulfato cérico; (C) Dragendorff; (D) cloreto férrico.

Somado a estes resultados existe o resultado do laudo técnico do CBA (Anexo 2). O ensaio foi feito pela Dra Waldireny Caldas Rocha, sob coordenação técnica do Dr Carlos Frederico Nogueira. Os resultados do laudo das cromatoplas (Figura 29) são descritos a seguir:

Foi observado nas placas (Figura 29) que o EGB apresenta pelo menos três constituintes majoritários (Rf 0,09; 0,20 e 0,66) sendo que a que eluiu mais rápido no sistema cromatográfico tem mancha mais intensa. Após reagir com reveladores específicos pode-se observar que estes constituintes pertençam a classe dos esteróides e terpenóides e que não apresentam atividade oxidante frente ao DDPH, nas concentrações analisadas. (Anexo 2)

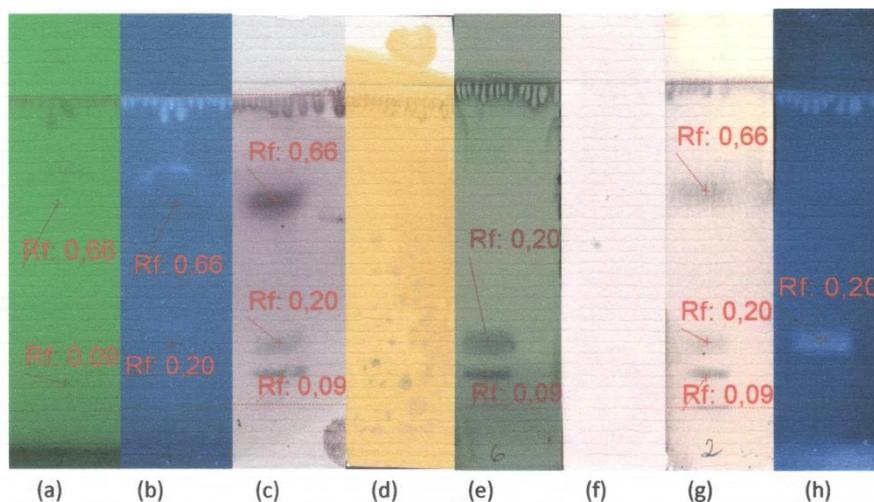


Figura 29. Análise da CCD realizada no CBA; EGB apenas submetido à secagem com rotaevaporador e “speed vac” sem fazer particionamento líquido/líquido. (a) UV 254 nm (b) UV 366 nm (c) Anisaldeído (d) Dragendorff (e) Ácido Fosfomolíbico (f) DPPH (g) Vanilina (h) NP/PEG.

Fonte: Laudo CBA (Anexo 2)

5.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise por RMN realizada no INPA com o espectrômetro de 60 MHz das fases de diclorometano (Figura 30) e acetato de etila (Figura 31) não mostraram picos que pudessem ser considerados para identificação de qualquer componente.

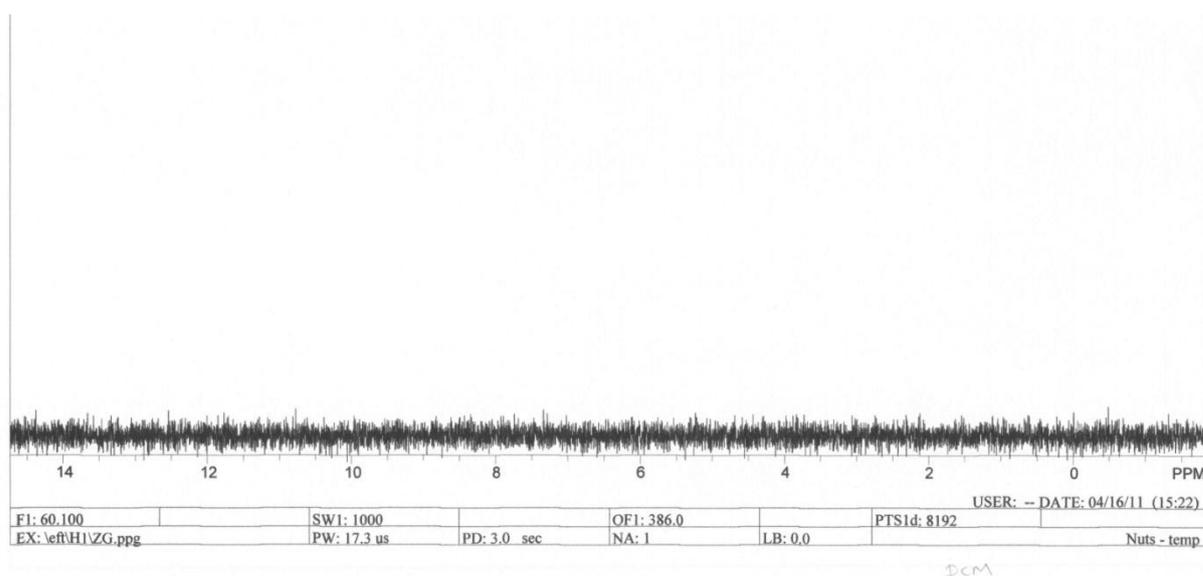


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da fase de Diclorometano em D_2O .

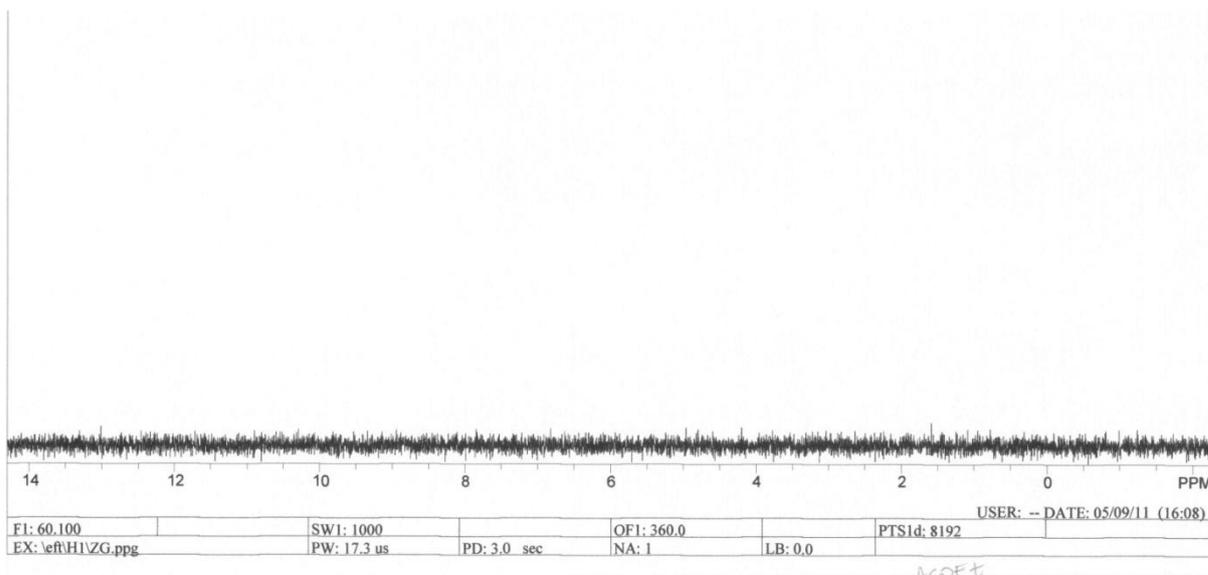


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da fase de Acetato de Etila em D_2O .

A fase aquosa (Figura 32) apresentou maior possibilidade de análise dentro da amplitude que o aparelho de 60 MHz permitiu. Observou-se que as regiões de maior quantidade de sinais estavam entre 0 e 6 ppm. O sinal de água deuterizada representado por um singleto de base larga estava entre 4,5 e 5, com o pico em 4,639. Entre 0 e 1, a presença de um sinal de dubleto que pode representar grupamentos metilas com picos em 0,606 e 0,707, podendo estar em particular o primeiro pico ligado a um esteróide ou, ainda, metilando compostos fenólicos ou açúcares. Entre 1 e 2, um sinal de próton com pequena amplitude em 1,519 poderia ser de sua ligação a carbono ligado a contíguo a uma ligação insaturada entre outros dois carbonos. Na faixa entre 2,5 e 3,5, um multipletto com 5 picos sendo o de maior amplitude o de 3,002, região essa característica de glicosídeos. Um sinal de pequena amplitude em 3,822 poderia indicar um hidrogênio carbonílico que poderia estar associado a um terpeno. Um sinal de pequena amplitude pode ser referente a um hidrogênio olefínico em ligação dupla, indicando a possibilidade de ser terpenos, tal como carotenóides (SILVERSTEIN et al., 2006).

Os sinais de esteróides podem ter sido camuflados pelo sinal de água deuterizada, já

que o aparelho era de 60 MHz. Os sinais de compostos fenólicos são dificilmente visualizados em RMN de próton pelo fato de seus hidrogênios serem muito substituídos, sendo que sua região corresponderia a sinais encontrados depois de 6 ppm (SILVERSTEIN et al., 2006), onde não foi verificada a existência de nenhum.

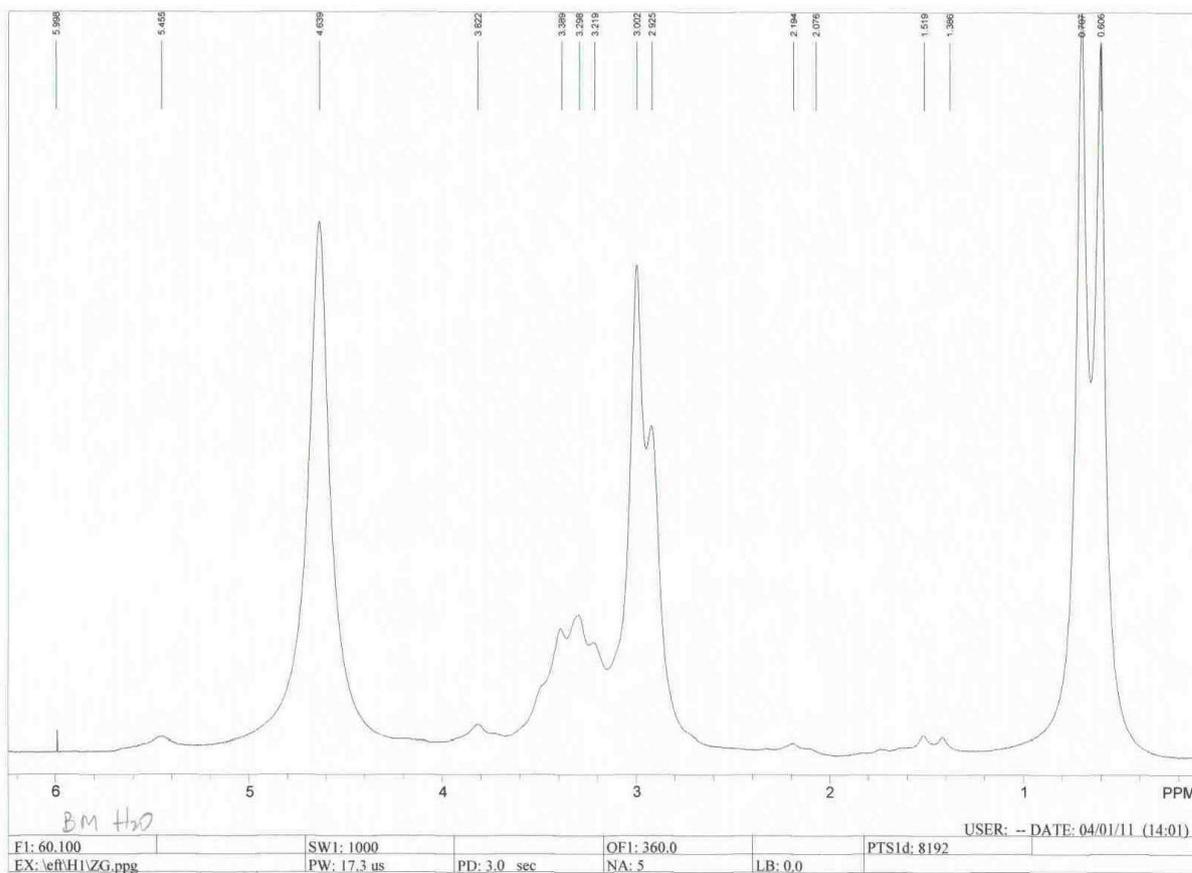


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da fase aquosa em D_2O .

6. DISCUSSÃO

O tratamento endodôntico tem como principal objetivo promover a desinfecção do sistema de canais radiculares por intermédio de meios químico-mecânicos. A limpeza e a modelagem dos canais radiculares seguidas de obturação hermética tridimensional e o selamento coronário são etapas essenciais no sucesso do tratamento endodôntico (CINTRA, 2008; SENA, 2009). Sabe-se que somente o preparo mecânico dos canais radiculares, caracterizado pela ação dos instrumentos endodônticos, é incapaz de promover a completa desinfecção de algumas áreas do sistema de canais radiculares devido a sua anatomia complexa com canais laterais, acessórios e delta apical levando-se em conta ainda os túbulos dentinários radiculares. Para tanto, cabe ressaltar a necessidade da utilização de substâncias químicas auxiliares com o intuito de promover uma significativa redução bacteriana no sistema de canais radiculares contribuindo para o sucesso do tratamento (SUNDQVIST, 1984).

Os mecanismos de controle de infecção têm sido alvo de profundas investigações científicas nas diferentes áreas da saúde. Na Endodontia a busca de esclarecimentos acerca dos processos de agressão e cura tem envolvido estudos minuciosos sobre as reações biológicas, mantendo frente a frente a Microbiologia, a Patologia e a Endodontia (ESTRELA, 2000).

A identificação dos micro-organismos presentes e predominantes nas infecções endodônticas possibilita a adoção de medidas destinadas ao controle microbiano e, conseqüentemente, o favorecimento do processo de reparação tecidual. O conhecimento dos fatores de virulência microbiana, que representam o seu grau de patogenicidade, leva a busca por agentes antimicrobianos que sejam eficazes e biocompatíveis (ESTRELA, 2000).

Os agentes antimicrobianos, normalmente, atuam pela supressão do crescimento de micro-organismos ou pela destruição destes. Os critérios necessários para a utilização de qualquer agente antimicrobiano para o tratamento de micro-organismos patogênicos são: a suscetibilidade do micro-organismo ao agente antimicrobiano; a penetração deste agente no sítio de infecção; o alcance e manutenção de concentrações adequadas do agente no sítio de infecção; a baixa toxicidade do agente antimicrobiano às células do hospedeiro, porém, deve haver inibição do crescimento ou morte dos micro-organismos; o não desenvolvimento de resistência a este agente pelos micro-organismos. Esses critérios requerem o conhecimento dos micro-organismos envolvidos na infecção, a suscetibilidade dos micro-organismos aos diferentes agentes antimicrobianos e a farmacocinética deste agente (ESTRELA, 2000).

Outro fator importante a ser considerado é o não desenvolvimento de resistência microbiana ao agente antimicrobiano. Os micro-organismos podem apresentar resistência ou não serem afetados. A resistência pode ser natural, inerente do próprio micro-organismo, ou adquirida, que se desenvolve conforme ocorre contato com o agente antimicrobiano (SUNDQVIST, 1984). As condições de vida da flora microbiana infecciosa no sistema de canais radiculares são provavelmente dependentes do potencial de óxido-redução local, da disponibilidade de nutrientes e do sistema de defesa do hospedeiro. Em infecções endodônticas persistentes, provenientes da necrose pulpar, o teor de oxigênio no canal radicular é baixo, o que contribui para a dominância das bactérias anaeróbias facultativas. As possíveis fontes de nutrientes no canal radicular são provenientes do tecido pulpar necrosado, exsudato inflamatório vindo pelo forame apical e da difusão do fluido bucal via lesão cariada (LEONARDO, 2005).

Nas infecções secundárias persistentes, também chamadas refratárias, é predominante a presença do coco anaeróbio facultativo Gram-positivo *E. faecalis*, associado ao fracasso do tratamento endodôntico do sistema de canais radiculares. Este micro-organismo pode adaptar-

se perfeitamente bem a fim de sobreviver ao meio necrótico pulpar e nos túbulos dentinários nos quais os suprimentos de sangue e oxigênio são limitados ou inexistentes, resistindo à antibioticoterapia, aos medicamentos intracanal utilizados atualmente e também ao preparo químico-mecânico (ESTRELA, 2000; EVANS et al., 2002; FIDGOR et al., 2003; STUART et al, 2006; BRAGA, 2007; JHAMB et al., 2010; MATHEW et al., 2010; SIQUEIRA-JR et al., 2010; MA et al., 2011).

Como uma etapa do tratamento endodôntico, pode ser eleita uma medicação intracanal que possua as características de agente antimicrobiano para debelar os focos infecciosos presentes (HOLLAND et al., 1992; ESTRELA et al., 1994; LEONARDO et al., 1994). Diversas composições podem ser citadas como exemplos de alternativas viáveis para esse procedimento. O óxido de zinco tem sido escolhido principalmente para a composição de cimentos obturadores endodônticos, mas suas propriedades antimicrobianas podem ser notadamente úteis para a desinfecção dos canais radiculares. Sua associação com o hidróxido de cálcio se torna vantajosa propiciando o aumento da radiopacidade, até a colaboração na atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e melhor reparo das lesões periapicais (GOMES et al., 2009a; QUEIROZ et al., 2009; RAMAR; MUNGARA, 2010).

O método de difusão em ágar usado neste estudo é um dos métodos *in vitro* mais utilizados para avaliar atividade antimicrobiana dos materiais odontológicos. Tem como vantagem permitir a comparação direta das pastas frente ao micro-organismo testado, indicando qual a pasta endodôntica que tem potencial de eliminar bactérias no meio ambiente do sistema de canais radiculares, sendo bastante utilizado para fornecer uma idéia do comportamento geral das substâncias testadas. O baixo custo e a simplicidade da técnica que não requer a utilização de equipamentos complexos para análise de resultados, também contribui na escolha desse teste para avaliar a atividade antimicrobiana das pastas (BRAGA, 2007; SENA, 2009; BANKAR, 2010; FALCÃO, 2010).

Entretanto, o método de difusão em ágar apresenta algumas limitações como a não distinção entre as propriedades bactericidas e bacteriostáticas do material testado e a influência da capacidade de difusão e dissociação do material no ágar devido às diferenças de viscosidade e solubilidade entre os materiais testados. As zonas de inibição podem não indicar o real efeito antimicrobiano das pastas submetidas ao teste e a quantidade de pasta utilizada no teste não corresponde à quantidade realmente usada clinicamente (LEONARDO et al., 2000; SPONCHIADO-JR, 2006; BRAGA, 2007; SENA, 2009). Portanto, o método de difusão em ágar é considerado apenas um estudo *in vitro* preliminar.

As pastas endodônticas idealizadas por este estudo teriam aplicação como medicação intracanal. Suas composições baseiam-se nos relatos que a literatura aponta sobre a atividade de substâncias já utilizadas na Endodontia. As associações entre ZnO e Ca(OH)₂ não inibiram a atividade antimicrobiana neste estudo, tanto no caso do PEG 400 quanto do EGB como veículo. No entanto, foi verificado estatisticamente que a pasta composta de EGB e ZnO testada obteve resultados compatíveis de inibição do crescimento bacteriano com a da CHX, que era o controle positivo, $p = 0,596$. Ao passo que quando o ZnO foi associado ao PEG 400 houve diferença estatisticamente significativa comparando com a CHX, com $p = 0,018$. Comparando-se a pasta de ZnO de EGB e de PEG 400, evidentemente o resultado foi significativo, com $p = 0,01$, mostrando que o uso do EGB foi particularmente eficiente para melhorar a atividade antimicrobiana frente a *E. faecalis*.

Avaliando a atividade de pastas compostas também por ZnO e Ca(OH)₂, Falcão (2010) não observou atividade antimicrobiana de nenhuma destas associações com o óleo de copaíba frente a *E. faecalis*. Em contrapartida, a fração de acetato de etila de tintura de *Pothomorphe umbellata* associada a Propilenoglicol obteve sucesso para debelar o *E. faecalis* no teste de difusão em ágar com um bom potencial para medicação intracanal, com diâmetros

maiores que aqueles dos halos de inibição da medicação à base de Ca(OH)_2 e Propilenoglicol (SPONCHIADO-JR, 2006).

O hidróxido de cálcio também tem muitas vantagens por estimular a indução de mineralização no organismo, além de atividade antiinflamatória, anti-exsudativa e também por ser antimicrobiano (HOLLAND; SOUZA, 1985). O uso do hidróxido de cálcio como medicamento tem suas restrições. Dependendo do veículo utilizado, a liberação de hidroxila pode levar mais tempo, no caso de ser oleoso ou hidrossolúvel viscoso, diminuindo sua eficácia imediata como antimicrobiano. Contudo, tem bom efeito para inibição de crescimento microbiano, em longo prazo, por ter a liberação lenta e contínua dos íons hidroxila, podendo ser, neste caso, um bom componente para cimentos endodônticos. Para ter ação rápida, o veículo deve ser hidrossolúvel aquoso, propiciando maior dissociação de íons hidroxila. Existe a necessidade de sua troca periódica, podendo ser indicado nesta situação apenas como medicação intracanal. É de suma importância que a pasta tenha um preenchimento do canal radicular efetivo para conseguir os efeitos terapêuticos esperados (ESTRELA et al., 1999; REZENDE et al., 2008).

O efeito que o hidróxido de cálcio provoca com a elevação do pH é bem interessante. O transporte de nutrientes e componentes orgânicos através da membrana citoplasmática é alterado de tal maneira que causa toxicidade bacteriana. O pH alto também ativa a enzima hidrolítica fosfatase alcalina que está intimamente relacionada ao processo de mineralização tecidual. Portanto, duas propriedades enzimáticas importantes para seu uso terapêutico: bactericida e indutor de mineralização (ESTRELA et al., 1999).

Vários fatores podem alterar o grau de dissociação e difusão do hidróxido de cálcio no interior dos túbulos dentinários. Essa alteração de pH dentinário é lenta e depende do veículo que foi empregado, da diferença de viscosidade, característica ácido-base, permeabilidade dentinária e nível de calcificação existente. O pH dentro dos canais, depois de aplicado o

medicamento à base de hidróxido de cálcio, permanece a 12,6 até 60 dias, enquanto que na superfície externa da raiz varia de 7 a 8 dependendo em qual terço se localiza (ESTRELA et al., 1999). É válido ressaltar que o *E. faecalis* sobrevive em ambientes alcalinos de cerca de pH 12 (SIQUEIRA-JR et al., 2010).

Mesmo observando essas propriedades, o Ca(OH)_2 não apresentou bons resultados no estudo que foi realizado. Independente do veículo utilizado ser PEG 400 ou EGB, não foi observada a inibição da atividade microbiana. Em contrapartida, existem estudos realizados que comprovaram a atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 contra *E. faecalis* (LEONARDO et al., 2000; MICKEL et al., 2003; DELGADO et al., 2010; JHAMB et al., 2010). Sua atividade pode ter sido diferente principalmente pelo fato de sua melhor atividade acontecer com maior tempo de contato em veículos hidrossolúveis viscosos como os que foram utilizados neste estudo (ESTRELA; HOLLAND, 2003). No entanto, sabe-se que as características de adaptação e resistência deste micro-organismo frente ao desafio de ambientes alcalinos estão bem descritas na literatura (EVANS et al., 2002; FIDGOR et al., 2003; SIQUEIRA-JR et al., 2010).

As propriedades do hidróxido de cálcio são apropriadas para o tratamento endodôntico, mas sua interação com o EGB não foi boa nos resultados deste estudo para compor uma nova medicação intracanal que debeat *E. faecalis*, diferente do que aconteceu com o ZnO.

A macrodiluição da pasta que obteve halos de inibição significantes foi realizada a fim de verificar a concentração inibitória mínima. Nenhuma concentração da pasta de ZnO com EGB conseguiu impedir o crescimento de *E. faecalis*. Talvez a pouca solubilidade do ZnO tenha tido influência sobre este resultado de maneira que a atividade antimicrobiana pôde ser observada em meio sólido, no entanto no meio líquido esse resultado não se fez possível pelas interações moleculares serem completamente diferentes. Athanassiadis et al. (2010)

realizaram um estudo que permitiu a avaliação antimicrobiana de pastas endodônticas frente a biofilmes de *E. faecalis* e não a bactérias de crescimento planctônico. Nessa metodologia se torna possível verificar a atividade antimicrobiana da pasta sem sua diluição, em contato direto com o biofilme, simulando o que provavelmente ocorre quando utilizada clinicamente na Endodontia, quando se refere ao biofilme formado nas paredes do canal radicular. Dessa maneira seria possível avaliar mais precisamente a atividade da pasta, pois sua diluição pode interferir na sua atividade antimicrobiana.

As formas planctônicas também estão presentes na microbiota do canal radicular, mas são eliminadas por métodos físicos como a irrigação/aspiração de substâncias auxiliares ao preparo químico-mecânico (CINTRA, 2008). O efeito da pasta à distância para debelar microorganismos invasores de túbulos dentinários e ramificações também deveria ser foco de nova pesquisa, como Gomes et al. (2009b) o fez em seu estudo verificando que a clorexidina teve maior atividade antimicrobiana na superfície externa radicular mostrando boa difusividade através dos túbulos dentinários em comparação com sua associação a pastas de ZnO e Ca(OH)₂.

A atividade antimicrobiana da banana foi verificada neste estudo. Compostos da banana possuem efeitos terapêuticos relatados pelo conhecimento da medicina tradicional. Dentre eles os taninos foram descritos (KELLOGG, 1927; EDDY; JONES, 1965; BENNETT et al., 2010) o que lhe confere grande potencial de atividade antitumoral, antiviral e antimicrobiana (OKUDA, 2005). Os flavonóides com poder antioxidante presentes na parede celular (BENNETT et al., 2010) da casca e polpa do fruto (JONES, 1965; JANG et al., 2002; DESHMUKH et al., 2009) permitem atividade antiinflamatória, hipolipidêmica e hipoglicêmica (VIJAYAKUMAR et al., 2008). Esteróides são encontrados na casca e polpa do fruto como a serotonina, dopamina e seus precursores como os triterpenos, triptofano, tirosina (YANG et al, 2000; JANG et al., 2002; DESHMUKH et al., 2009; OHLA et al.,

2011) possuem propriedades hipocolesterômicas, antinociceptiva, antiinflamatória, além da ação antitumoral (OLIVEIRA, 2007). As lectinas possuem poder antiviral (MARTINS et al., 2009; SWANSON et al., 2010) e as catequinas encontradas na polpa são potentes antioxidantes (BENNETT et al., 2010). E o efeito antimicrobiano da *Musa paradisiaca* é descrito na literatura (GOEL et al., 1989; SHARMA et al., 1989; BANKAR et al., 2010).

O EGB é certamente uma mistura complexa de diferentes componentes, sendo importante a identificação de quais deles podem estar sendo responsáveis pela atividade antimicrobiana. Dentre os princípios ativos que podem ser componentes do extrato, deve-se ressaltar a provável presença de taninos, flavonóides, terpenos e esteróides evidenciadas pela Cromatografia de Camada Delgada. A reação que acontece entre o PEG e essas moléculas forma um novo composto (JONES, 1965) que pode ter catalisado reações químicas para incrementar a propriedade antimicrobiana. Estes reagentes devem ter causado aumento da atividade do ZnO com uma relação cooperativa ou formando novo princípio ativo que possibilitou a melhor atividade antimicrobiana. Isto foi provavelmente causado por uma interação molecular com a membrana citoplasmática ou parede celular da bactéria, criando um meio para que moléculas de princípios ativos fossem carregadas para dentro da célula bacteriana e pudessem causar atividade citotóxica. Estudos futuros mais aprofundados são necessários para compreensão do mecanismo de ação da associação entre ZnO e EGB.

A fim de analisar a composição do extrato glicólico de *Musa paradisiaca*, efetuou-se o uso de uma metodologia que auxilia na determinação da constituição química de um fitoterápico. A Espectrometria de Massas por ionização em Electrospray é capaz de identificar componentes presentes em amostras complexas. A análise realizada no EGB sugere a presença de um componente majoritário: a maltose. Os espectros encontrados tiveram características muito semelhantes aos espectros encontrados por Araújo (2005) quando fez um perfil das massas moleculares dos componentes de diferentes tipos de cervejas utilizando a

mesma técnica. Comparando ao estudo de Ohla et al. (2011), que encontrou o peso molecular da maltose na banana por meio da EM, confirmou-se a presença deste açúcar em sua composição. Há a possibilidade de constituintes terem sido glicosilados e tornado as características do EGB mais propícias a atingir o *E. faecalis*.

Em princípio os açúcares deveriam servir como nutrientes para esses micro-organismos e auxiliariam sua proliferação. No entanto, o efeito foi contrário, ao ser verificada a inibição de crescimento em tapete sobre o meio MHA quando avaliado apenas o EGB (Figura 12) e atividade bactericida associando-se EGB ao ZnO (Figura 13) no teste de difusão em ágar. Assume-se aqui a importância de uma possível relação do sistema maltose conforme estudado para a *Escherichia coli* (*E. coli*). Este sistema persistiu como um exemplo de regulação positiva de um grupo de genes e sua misteriosa conexão entre o metabolismo da maltose e a suscetibilidade de *E. coli* pela infecção do vírus “phage λ ”. Descobriu-se o receptor (LamB) responsável pela ligação de “ λ ” durante o estudo para sua atividade sobre *E. coli* e, ainda, foi demonstrado que essa proteína externa de sua membrana citoplasmática constituía um canal para a passagem de açúcares através dela. Tem sido demonstrada a participação direta do carreador na regulação transcricional, indicando sua influência na expressão de genes de bactérias, a qual possui alguma dependência das taxas de entrada de substrato e também da própria presença física do mesmo (BOOS; SHUMAN, 1998). Portanto, presume-se que a presença de maltose pode ter ativado moléculas que produzam o efeito bactericida, podendo estar presentes no EGB ou na própria bactéria, ou ainda desativando moléculas que seriam importantes para a defesa da bactéria.

A desnaturação de proteínas de veneno de cobra foi verificada *in vitro* pela reação com moléculas da seiva de bananeira, que poderiam ser polifenóis e taninos. No entanto, não houve sucesso quando utilizado *in vivo* o extrato da seiva de bananeira, pois seus componentes reagiram antes com proteínas plasmáticas ao serem injetadas nos roedores, não

podendo reagir com as proteínas do veneno presentes no organismo dos animais (BORGES, 2005). Esse mecanismo de ativação ou desativação molecular pode ser a resposta para a atividade antimicrobiana apresentada pelo EGB frente a *E. faecalis*, supondo a presença de flavonóides, taninos, terpenos e esteróis nesta mistura complexa, confirmada a hipótese da presença destes grupamentos químicos na literatura (JONES, 1965; YANG et al, 2000; JANG et al., 2002; DESHMUKH et al., 2009; BENNETT et al., 2010; OHLA et al., 2011). Ressalta-se que os sinais intensos de dissacarídeos provavelmente causou supressão de sinais iônicos de outros analitos (OHLA et al., 2011), portanto as classes moleculares propostas pela Cromatografia de Camada Delgada podem ter tido seus sinais suprimidos na EM por Electrospray por essa razão.

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, outra metodologia utilizada, tem a capacidade de apontar a presença de moléculas orgânicas biologicamente ativas presentes em extratos (SOUZA; LAVERDE-JR, 2002; OLIVEIRA, 2005). A quantificação de artemisinina em extrato de *Artemisia annua* valeu-se dessa metodologia (CASTILHO et al., 2008; LIU et al., 2010). Conceber sua real atividade biológica frente ao patógeno em foco poderia ser determinante para avaliar as propriedades inerentes do fitoterápico, entretanto pouco foi possível perceber, pois o EGB é uma mistura complexa de moléculas. A RMN de prótons pode ser ineficiente para a detecção de moléculas com anéis fenólicos, visto que os hidrogênios ligados a esses são muito substituídos por hidroxilas em solução. Isso justificaria a ausência de sinais na faixa do espectro que representariam esses componentes que estariam acima de 5,5 ppm. Também foi possível observar multipletos na área de carboidratos representando forte sinal dessas moléculas na fase aquosa. A referência da água deuterizada teve um singleto com base larga e muitos sinais de esteróides podem ter sido suprimidos pela sensibilidade do aparelho utilizado não ser muito alta, apenas de 60 MHz. No entanto, pode-se observar vários sinais que seriam associados a moléculas de terpenos e também um

grupamento metila possivelmente de esteróide.

Estudos fitoquímicos são imprescindíveis para identificação de marcadores químicos e compostos correlacionados a uma dada ação terapêutica preconizada pelo uso popular (COE; ANDERSON, 1999; GROVER et al., 2002; KALA, 2005; NETO et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; GIORGETTI et al., 2007; GOMES, 2008; COELHO-FERREIRA, 2009). O conhecimento da correlação estrutura-atividade permite a quantificação de ativos para controle de qualidade química e também a definição de doses e posologias de ativos fitoterápicos. Ativos de plantas podem atuar em conjunto, formando fitocomplexo. Experimentos com classes de compostos ou mesmo substâncias isoladas servem como indicadores de eventual ação sinérgica de ativos. Além disso, estudos para evidenciar correlação dose-efeito dos constituintes que exibem a atividade antimicrobiana devem ser prosseguidos, bem como estudos farmacotécnicos que permitam o preparo de uma formulação ideal para ser utilizada com segurança e eficácia em tratamentos endodônticos.

Baseado no exposto, verifica-se a necessidade de estudos adicionais para identificar qual seria o componente ativo dentre os citados que poderia ter papel na atividade antimicrobiana do Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca*, bem como sua biocompatibilidade e propriedades físico-químicas para poder ser empregado futuramente como medicação intracanal na Endodontia, sendo o teste *in vitro* apenas preliminar, apesar de apresentar resultados favoráveis que evidenciam atividade antimicrobiana frente a *E. faecalis*.

7. CONCLUSÃO

Baseado na metodologia usada neste estudo, pode-se concluir que:

- O Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* não teve atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*.
- Este estudo evidenciou a atividade antimicrobiana da pasta composta por Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* e Óxido de Zinco frente a *Enterococcus faecalis*.
- Nenhuma concentração da pasta de Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* e Óxido de Zinco foi capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* pela técnica da Macrodiluição.
- A Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray permitiu propor a maltose como um constituinte de peso molecular majoritário do Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca*.
- A Cromatografia de Camada Delgada sugeriu a presença dos seguintes grupamentos químicos no Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca*: flavonóides, taninos, terpenos e esteróides.
- A Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear mostrou picos que inferem grande quantidade de carboidratos e alguns picos que poderiam ser referentes principalmente a terpenos.

8. REFERÊNCIAS

ABNADER, C. D. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente à *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis*.** 2005. 141 f. Dissertação (Mestrado)-Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-54, 2007.

AL-AHMAD, A.; MAIER, J.; FOLLO, M.; SPITZMÜLLER, B.; WITTMER, A.; Elmar HELLWIG, E.; HÜBNER, J.; JONAS, D. Food-borne Enterococci Integrate Into Oral Biofilm: An *in vivo* Study. **J Endod**, v. 36 p. 1812-9, 2010.

AL-NAZHAN, S.; AL-OBAIDA, M. Effectiveness of a 2% chlorhexidine solution mixed with calcium hydroxide against *Candida albicans*. **Aust Endod J**, v. 34, p. 133–5, 2008.

ALVES, E. J. **A cultura da banana: Aspectos técnicos, sócio-econômicos e agro-industriais.** 2º ed. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas, 1999.

AMARAL, R. R.; AMORIM, J. C. F.; NUNES, E.; SOARES, J. A.; SILVEIRA, F. F. Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura. **RFO**, v. 15, n. 2, p. 207-11, 2010.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **B J I D**, v. 12, p. 526-30, 2008.

ARAUJO, A. S. **Análise e tipificação de diferentes amostras de cervejas através de espectrometria de massas por ionização electrospray.** 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ARIAS-MOLIZ, M. T.; FERRER-LUQUE, C. M.; ESPIGARES-GARCIA, M.; BACA, P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. **JOE**, v. 35, n. 5, p. 711-14, 2009.

ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P. V.; GEORGE, N.; WALSH, L. J. An *in vitro* study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Aust Dent J**, v. 55, 150–5, 2010.

BACA, P.; JUNCO, P.; ARIAS-MOLIZ, M. T.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. P.; FERRER-LUQUE, C. M. Residual and Antimicrobial Activity of Final Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm in Dentin. **J Endod**, v. 37, p. 363–6, 2011.

BADR, A. E.; OMAR, N.; BADRIA, F. A laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of Liquorice when used as root canal medicament. **Int End J**, v. 44, p. 51–8, 2011.

BANDEIRA, M. F. C. L. **Análise comparativa sobre a compatibilidade biológica do óleo essencial e do óleo in natura da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio em capeamento pulpar em dentes de cães.** 2000. 205 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

BANDEIRA, M. F. C. L. **Estudo comparativo da compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao hidróxido de cálcio, em diferentes níveis de pesquisa: farmacológico, microbiológico e molares de rato.** 1998. 265 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; BENATTI NETO, C.; LIA, R. C. C. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio- parte II. **J Bras Clín Est Odontol**, v.3, n.16, p. 43-48, 1999a.

BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; PIZZOLITO, A. C., BENATTI-NETO, C.; JORGE-NETO, J. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). **JBC**, v. 3, n. 16, p. 39-41, 1999b.

BANKAR, A.; JOSHI, B.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, p. 45–50, 2010.

BAUMGARTNER, J. C.; WATTS, C. M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in Infections of Endodontic Origin. **JOE**, v. 26, n. 12, 2000.

BENNETT, R. N.; SHIGA, T. M.; HASSIMOTTO, N. M. A.; ROSA,† E. A. S.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Phenolics and Antioxidant Properties of Fruit Pulp and Cell Wall Fractions of Postharvest Banana (*Musa acuminata* Juss.) Cultivars. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 7991–8003, 2010.

BOOS, W.; SHUMAN, H. Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 204-29, 1998.

BORGES, M. H.; ALVES, D. F. L.; RASLAN, D. S.; PIL´O-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **J Ethnopharmacol**, v. 98, p. 21-9, 2005.

BRAGA, M. R. C. L. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de diferentes cimentos endodônticos.** 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical – Biodiversidade: Princípios bioativos e pró-saúde em recursos naturais amazônicos)-Programa de Pós-graduação em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

BRAGA, R. Plantas do Ceará. **Revista do Instituto do Ceará**, p. 145-75, 1949.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. CEAGESP. **Ficha da Banana**, 2004. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/hortiescolha/anexos/ficha_banana.pdf>. Acesso em: 2 maio 2011.

CASTILHO, P. C.; GOUVEIA, S. C.; RODRIGUES, A. I. Quantification of artemisinin in *Artemisia annua* extracts by ¹H-NMR. **Phytochem Anal**, v.19, p. 329–34, 2008.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPER, S. G.; MESSER, H. H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. **Int End J**, v. 41, p. 873–82, 2008.

CINTRA, L. T. A. **Análise histológica e radiográfica da influência de substâncias químicas auxiliares e medicação intracanal no processo de reparo periapical em dentes de cães**. 2008. 245 f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica, área de Endodontia)-Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2008.

COE, G. F.; ANDERSON, G. J. Ethnobotany Of The Sumu (Ulwa) Of Southeastern Nicaragua And Comparisons With Miskitu Plant Lore. **Econ Botany**, v. 53, n.4, p. 363-86, 1999.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **J Ethnopharmacol**, v.126, p. 159–75, 2009.

COSTA, E. M. M. B; ESMERALDO, M. R. A.; CARVALHO, M. G. F.; DANIEL, R. L. A. P.; PASTRO, M. F.; SILVA-JUNIOR, F. L. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em Endodontia sobre *Enterococcus faecalis*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 8, n. 1, p. 21-25, 2008.

DAVIS, J. M.; MAKI, J.; BAHCALL, J. K. An In Vitro Comparison of the Antimicrobial Effects of Various Endodontic Medicaments on *Enterococcus faecalis*. **JOE**, v. 33, n. 5, 2007.

DELGADO, R. J. R.; GASPAROTO, T. H.; SIPERT, C. R.; PINHEIRO, C. R.; MORAES, I. G.; GARCIA, R. B.; BRAMANTE, C. M.; CAMPANELLI, A. P.; BERNARDINELI, N. Antimicrobial Effects of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 36, p. 1389–93.

DESAI, S.; CHANDLER, N. Calcium Hydroxide–Based Root Canal Sealers: A Review. **J Endod**, v. 35, p. 475–80, 2009.

DESHMUKH, M. H.; PAI, S. R.; NIMBALKAR, M. S.; PATIL, R. P. Biochemical Characterization of Banana Cultivars From Southern India. **Int J Fruit Science**, v. 9, n. 4, p. 305-22, 2009.

EDDY, W. H.; KELLOGG, M. The Place Of The Banana In The Diet. **American Journal of Public Health**, p. 27-35, 1927.

ENNOS, A. R.; SPATZ, A-Ch.; SPECK, T. The functional morphology of the petioles of the banana, *Musa textilis*. **J Experiment Botany**, v. 51, n. 353, p. 2085-93, 2000.

ESTRELA, C. R. A. **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares**. 95 f. 2000. Dissertação (Mestrado Microbiologia)-Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

ESTRELA, C.; BAMMANN, L. L.; PIMENTA, F. C.; PÉCORA, J. D. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **Int Endod J**, v. 34, p. 341-5, 2001.

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

ESTRELA, C.; PÉCORA, J. D.; SOUZA-NETO, M. D.; ESTRELA, C. R. A.; BAMMANN, L. L. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J**, v. 10, p. 63-72, 1999.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BAMMANN, L. L.; FELIPPE-JR. O estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **Rev Fac Odontol Bauru**, v. 2, p. 31-38, 1994.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQUIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, v. 35, p. 221-8, 2002.

FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; OHMAN, A. E.; MOLLER, A. J. R. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand J Dent Res**. v. 90, p. 134-144, 1982.

FALCÃO, L. S. **Avaliação in vitro da Atividade Antimicrobiana de Diferentes Pastas Endodônticas à base de Copaíba**. 142 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

FALCONI-FILHO, A. Banana (parte I). **Artigo**, Juiz de Fora, 01 abr. 2008. Disponível em: <http://www.acesa.com/vidasaudavel/arquivo/ser_holistico/2008/04/01-artigo/>. Acesso em: 10 dez. 2008.

FERRER-LUQUE, C. M.; ARIAS-MOLIZ, M. T.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. P.; BACA, P. Antimicrobial Activity of Maleic Acid and Combinations of Cetrimide with Chelating Agents against *Enterococcus faecalis* Biofilm. **J Endod**, v. 36,1673-5, 2010.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, p. 234-239, 2003.

FUJII, R.; SAITO, Y.; TOKURA, Y.; NAKAGAWA, K. I.; OKUDA, K.; ISHIHARA, K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, p. 502-5, 2009.

GARRIDO, A. D. B.; LIA, R. C. C. ; FRANÇA, S. C.; SILVA, J. F., ASTOLFI-FILHO, S. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. **Int Endod J**, v. 43, p. 283-91, 2010

GARRIDO, A. D. B.; LIA, R. C. C.; TORRES, S. C. Z.; FONSECA, T. S.; PEREIRA, J. V.; SPONCHIADO-JR, E. C.; FRANÇA, S. C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Amostras do Óleo-Resina da Copaíba em Micro-organismos da Microbiota Endodôntica. **Brazilian Oral Research**, v.18, p. 210, 2004.

GENTIL, M.; PEREIRA, J. V.; SOUSA, Y. T.; PIETRO, R.; NETO, M.D.; VANSAN, L. P.; DE CASTRO FRANCA, S. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytother Res**, v. 20, n.3, p.184-6, 2006.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system—A study of historical sources from the 16th to 19th century. **J Ethnopharmacol**, v.109, p. 338–47, 2007.

GOEL, K.; GOVINDA, D.; SANYA, K. *In vivo* antimicrobial activity of *Musa paradisiaca* L. root extracts. **Fitoterapia**, v. 60, n. 2, p. 157-8, 1989.

GOMES, B. P. F. A.; JACINTO, R. C.; PINHEIRO, E. T.; SOUZA, E. L. R.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. Molecular Analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* Associated With Primary Endodontic Infections and Failed Endodontic Treatment. **JOE**, v. 32, n. 10, 2006.

GOMES, B. P. F. A.; MARTINHO, F. C.; VIANNA, M. E. Comparison Of 2.5% Sodium Hypochlorite And 2% Chlorhexidine Gel On Oral Bacterial Lipopolysaccharide Reduction From Primarily Infected Root Canals. **JOE**, v. 35, n. 10, p. 1350-3, 2009a.

GOMES, B. P. F. A.; MONTAGNER, F.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; ALMEIDA, J. F. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. **Journal Of Dentistry**, v. 37, p. 76-81, 2009b.

GOMES, B. P. F. A.; MONTAGNER, F.; JACINTO, R. C.; PINHEIRO, E. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, p. 519-25, 2008.

GOMES, L. R. **Plantas medicinais e fitoterápicos utilizados na Odontologia**. 2008. 87 f. Monografia (Graduação)-Graduação do curso de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, UFAM, Manaus, 2008.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **J Ethnopharmacol**, v. 81, p. 81-100, 2002.

GUINESI, A. S.; ANDOLFATTO, C.; BONETTI-FILHO, I.; CARDOSO, A. A.; PASSARETI-FILHO, J.; FARAC, R. V. Ozonized oils: a qualitative and quantitative analysis. **Braz. Dent. J.** [online]., v. 22, n. 1, p. 37-40, 2011.

HOCKETT, J. L.; DOMMISCH, J. K.; JOHNSON, J. D.; COHENCA, N. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an *in vitro* study. **JOE**, v. 34, n. 11, p. 1374-77, 2008.

HOLLAND, R.; SOARES, I. J.; SOARES, I. M. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dog's teeth with apical periodontitis. **Endod Dent Traumatol**, v. 8, p. 223-229, 1992.

HOLLAND, R.; SOUZA, V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induced hard tissue formation. **J Endod**, v. 11, p. 535-43, 1985.

IMURA, N.; PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. The Outcome of Endodontic Treatment: A Retrospective Study of 2000 Cases Performed by a Specialist. **JOE**, v. 33, n. 11, 2007.

JACINTO, R. C.; MONTAGNER, F.; SIGNORETTI, F. G. C.; ALMEIDA, G. C.; GOMES, B. P. F. A. Frequency, Microbial Interactions, and Antimicrobial Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* Isolated from Primary Endodontic Infections. **JOE**, v. 34, n. 12, 2008.

JANG, D. S.; PARK, E. J.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Constituents of *Musa paradisiaca* Cultivar with the Potential To Induce the Phase II Enzyme, Quinone Reductase. **J Agric Food Chem**, v. 50, 6330-4, 2002.

JESUS, S. C.; FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L. Caracterização Física e Química de Frutos de Diferentes Genótipos de Bananeira. **Bragantia Campinas**, v. 63, n. 3, p. 315-23, 2004.

JHAMB, S.; NIKHIL, V.; SINGH, V. An in vitro study of antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **Indian J Dent Res**, v. 21, n. 4, 2010.

JONES, D. E. Banana tannin and its reaction with polyethylene glycols. **Nature**, v. 206, n. 981, p. 299-300, 1965.

KALA, C. P. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. **J Ethnobiology Ethnomedicine**, v. 1, n. 11, 2005.

KAYAOGLU, G.; ERTEN, H.; ØRSTAVIK, D. Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, p. 449-54, 2008.

KAYAOGLU, G.; OMÜRLÜ, H.; AKCA, G.; GÜREL, M.; GENÇAY, Ö.; SORKUN, K.; SALIH, B. Antibacterial Activity of Propolis versus Conventional Endodontic Disinfectants against *Enterococcus faecalis* in Infected Dentinal Tubules. **J Endod**, v. 37, p. 376-81, 2011.

KISHEN, A.; SHI, Z.; SHRESTA, A.; NEOH, K. G. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. **JOE**, v. 34, n. 12, p. 1515-20, 2008.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, Jr. W.C. **Diagnóstico Microbiológico** - Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.

LAVERDE-JR, A. **Estudos de RMN aplicados à Química Supramolecular e discriminação enantiométrica**. 2001. 294 f. Tese (Doutorado)-Pós-graduação do Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2001.

LEONARDO, M. R. **Endodontia**: Tratamento dos canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

LEONARDO, M. R.; ALMEIDA, W. A.; ITO, I. Y.; SILVA, L. A. B. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canal of dog's teeth with experimentally induced chronic lesion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, p. 232-8, 1994.

LEONARDO, M. R.; HERNANDEZ, M. E. F. T.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad Endod**, v. 102, n. 5, 2006.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU-FILHO, M.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Sealers and Pastes Used in Endodontics. **JOE**, v. 26, n. 7, 2000.

LEWIS, D.; FIELD, W.; SHAW, G. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca* L) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosion. **J Ethnopharmacol**, v. 65, n. 3, p. 283-8, 1999.

LIN, L. M.; LIN, J.; ROSENBERG, P. A. One-appointment endodontic therapy: Biological considerations. **JADA**, v. 138, n. 11, p. 1456-62, 2007.

LIU, N. Q.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; KOOY, F. Comparative Quantitative Analysis of Artemisinin by Chromatography and qNMR. **Phytochem Anal**, [online: DOI 10.1002/pca.1217], 23 mar 2010.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**, v. 34, p. 399-405, 2001.

MA, Z.; WANG, Y.; ZHU, X.; ZHANG, C.; LI, S.; JIN, L.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Role of Polymorphonuclear Neutrophils in the Clearance of *Enterococcus faecalis* Derived from Saliva and Infected Root Canals. **J Endod**, v. 37, p. 346-52, 2011.

MACIEL, M. R. A.; GUARIM-NETO, G. Um olhar sobre as benzedadeiras de Juruena (Mato Grosso, Brasil) e as plantas usadas para benzer e curar. **Bol Mus Para Emílio Goeldi Ciências Humanas**, Belém, v. 1, n. 3, p. 61-77, set-dez. 2006.

MAPRIC. Extrato glicólico de banana. **Certificado de análise**. Fev. 2010

MARTINS, F. O.; FINGOLO, C. E.; KUSTER, R. M.; KAPLAN, M. A. C.; ROMANOS, M. T. V. Atividade antiviral de *Musa acuminata* Colla, Musaceae. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 3, 2009.

MATHEW, S.; YAW-CHYN, L.; KISHEN, A. Immunogenic Potential of *Enterococcus faecalis* Biofilm under Simulated Growth Conditions. **J Endod**, v. 36, p. 832–6, 2010.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S.; ANDREATA, R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos siti Anal Bioanal Chem (2011) 399:1853–1857 antes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Bot Bras**, v. 18, n. 2, p. 391-399, 2004.

MICKEL, A. K.; NGUYEN, T. H.; CHOGLE, S. Antimicrobial Activity of Endodontic Sealers on *Enterococcus faecalis*. **JOE**, v. 29, n. 4, 2003.

MONDAL, S. K.; RAY, B.; THAKUR, S.; GHOSAL, P. K. Isolation, purification and some structural features of the mucilaginous exudate from *Musa paradisiaca*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 263-71, 2001.

MOREIRA, R. S. **Banana: Teoria e Prática de Cultivo**. São Paulo: Fundação Cargill, 2ª Ed., 1999.

MURAD, C.; FARINIUK, L. F.; FIDEL, S.; FIDEL, R. A. S.; SASSONE, L. M. Bacterial leakage in root canals filled with calcium hydroxide paste associated with different vehicles. **Braz Dent J**, v. 19, n. 3, 2008.

NAIR, P. N. R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K. E.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in 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. 580-8, 1990.

NAIR, P. N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after ‘one-visit’ endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, p. 231–52, 2005.

NETO, I. C.; SANTOS, C. C.; SOUSA, M. C. F. S. **Projeto CALÚ: A promoção da saúde como um eixo para melhorar a qualidade de vida numa comunidade remanescente de quilombolas**. 2006. 16 f. Relatório de Pesquisa – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.

OHLA, S.; SCHULZE, P.; FRITZSCHE, S.; BELDER, D. Chip electrophoresis of active banana ingredients with label-free detection utilizing deep UV native fluorescence and mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, 1853–7, 2011.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-31, 2005.

OLIVEIRA, A. B. **Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae.** 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.).** 2005. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ORIE, N. N. Direct Vascular Effects of Plantain Extract in Rats. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 501-506, 1997.

OZBEK, S. M.; OZBEK, A.; ERDOGAN, A. S. Analysis Of *Enterococcus faecalis* In Samples From Turkish Patients With Primary Endodontic Infections And Failed Endodontic Treatment By Real-Time PCR Sybr Green Method. **J Appl Oral Sci**, v. 17, n. 5, p. 370-4, 2009.

PALLOTTA, R. C.; RIBEIRO, M. S.; MACHADO, M. E. L. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. **Aust Endod J**, v. 33, p. 107–11, 2007.

PARI, L.; UMA-MAHESWARI, J. Hypoglycaemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 68, p. 321-5, 1999.

PARK, D.; LIM, S. R.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. Development of a new Cr(VI)-biosorbent from agricultural biowaste. **Biosure Technology**, v. 99, p. 8810-8, 2008.

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

PERIN, F. M.; FRANÇA, S.; SAQUY, P. C.; SOUSA-NETO, M. D. Avaliação antimicrobiana *in vitro* de extratos aquosos fitoterápicos para uso endodôntico. **Pesq Odontol Bras**, v.15, n.1, p.144, 2001.

QUEIROZ, A. M.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; ASSED, S.; SILVA, R. A. B.; ITO, I. Y. Antibacterial Activity of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth: Zinc Oxide and Eugenol Cement, Calen Paste Thickened with Zinc Oxide, Sealapex and EndoREZ. **Braz Dent J**, v. 20, n. 4, p. 290-6, 2009.

RAMAR, K.; MUNGARA, J. Clinical and radiographic evaluation of pulpectomies using three root canal filling materials: an *in vivo* study. **J Indian Soc Pedod Prevent Dent**, v. 28, n. 1, 2010.

REZENDE, G. P. S. R.; COSTA, L. R. R. S.; PIMENTA, F. C.; BARONI, D. B. *In vitro* Antimicrobial Activity of Endodontic Pastes with Propolis Extracts and Calcium Hydroxide: A Preliminary Study. **Braz Dent J**, v. 19, n. 4, p. 301-5, 2008.

RÔÇAS, I. N.; HÜLSMANN, M.; SIQUEIRA-JR, J. F. Microorganisms in Root Canal-treated Teeth from a German Population. **JOE**, v. 34, n. 8, 2008.

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

SAVIOLI, R. N. **Estudo da influência de cada componente químico do cimento de Grossman sobre as suas propriedades físicas**. 1992. 123 f. Dissertação (Mestrado)-Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1992.

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, p. 6-9, 1995.

SENA, N. T. **Propriedades Antimicrobianas do cimento AHPlus, do sistema Epiphany e de cones de guta-percha e Resilon desinfetados**. 2009. 196 f. Tese (Doutorado)-Clínica Odontológica, Endodontia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2009.

SHARMA, K. S.; PORWAL, K. M.; METHA, B. K. In vitro antimicrobial activity of *Musa paradisiaca* root extracts. **Fitoterapia**, v. LX, p. 157-8, 1989.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006

SIQUEIRA-JR, J.F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2001.

SIQUEIRA-JR, J.F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P. Medicação intracanal. In: LOPES, H.P.; SIQUEIRA-JR, J.F. **Endodontia: Biologia e Técnica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010.

SOUZA, A. A.; LAVERDE-JR, A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica Dosy. **Quím Nova**, v. 25, n. 6, p. 1022-6, 2002.

SPONCHIADO-JR, E. C.; PEREIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. A.; MINATEL, D.; SOUSA NETO, M. D.; PIETRO, R. C. L. Avaliação da ação Antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio e barbatimão em diferentes concentrações. **J Bras Fitomedicina**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 12-15, 2005.

SPONCHIADO-JR, E. C. **Atividade antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata***. 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **JOE**, v. 32, n. 2, 2006.

SUBRAMANIAN, K.; MICKEL, A. K. Molecular Analysis of Persistent Periradicular Lesions. **JOE**, v. 35, n. 7, Jul, 2009.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, p. 522–30, 1994.

SUNZEL, B.; LASEK, J.; SÖDERBERG, T.; ELMROS, T.; HALLMANS, G.; HOLM, S. The effects of zinc oxide on *Staphylococcus aureus* and polymorphonuclear cells in a tissue cage model. **Scand J Plast Reconstr Hand Surg Hand**, v. 24, n. 1, p. 31-5, 1990.

SWANSON, M. D.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J.; MARKOVITZ, D. M. A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **J Biol Chem**, v. 285, n. 12, 2010.

VALERA, M. C.; REGO, J. M.; JORGE, A. O. C. Effect of Sodium Hypochlorite and Five Intracanal Medications on *Candida albicans* in Root Canals. **JOE**, v. 27, n. 6, 2001.

VEGA, E. Z.; GLATZ, B. A.; HAMMOND, E. G. Optimization of Banana Juice Fermentation for the Production of Microbial Oil. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 748-52, 1988.

VIANNA, M. E.; GOMES, B. P. F. A. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, p. 585-9, 2009.

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

VIJAYAKUMAR, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI N. R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia**, v. 79, p. 279–82, 2008.

WAGNER, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. **Plant Drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

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

WESTERLON, R. **Análise fitoquímica, avaliações de bioatividade *in vitro* e *in vivo* de *Raulinoa echinata***. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale de Itajaí, Itajaí, 2006.

WINDA, A. Cytotoxic test of ambon banana stem sap (*Musa paradisiaca sapientum* L.) to fibroblast cells. **Kedokteran Gigi**, p. 366, 2011.

YANG, C.-P.; FUJITA, S.; ASHRAFUZZAMAN, M. D.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 7, p. 2732-5, 2000.

ZHANG, H.; SHEN, Y.; RUSE, N. D.; HAAPASALO, M. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. **J Endod** v. 35, p. 1051–5, 2009.

9. APÊNDICES

Apêndice 1

TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Halos de inibição em milímetros obtidos pela atividade antimicrobiana dos compostos frente a *E. faecalis* em meio MHA. Tamanho dos poços equivale a 0,8mm.

EXPERIMENTO A	I	II	III	IV	V
1 - PEG 400 (controle negativo)	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
2 - PEG 400 + Ca(OH) ₂	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
3 - EGB	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
4 - EGB + Ca(OH) ₂	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
5 - CHX (controle positivo)	1,9	3,4	3,4	1,9	2
EXPERIMENTO B	I	II	III	IV	V
1 - PEG 400 (controle negativo)	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
2 - PEG 400 + ZnO	Nulo	nulo	nulo	1,1	1,1
3 - PEG 400 + ZnO + Ca(OH) ₂	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
4 - EGB + ZnO	1,2	1,4	1,3	1,3	1,3
5 - EGB + ZnO + Ca(OH) ₂	Nulo	nulo	nulo	nulo	nulo
6 - CHX (controle positivo)	2,5	2,4	2,3	2	1,9

Apêndice 2

CIM – MACRODILUIÇÃO

Valores de transmitância obtidos pelo espectrofotômetro nos Experimentos “A” e “B”.

EXPERIMENTO	A	B
tubo 12 - Meio sem alíquota inóculo – Controle Negativo	NULO	NULO
tubo 11 - Meio + alíquota inóculo – Controle Positivo	0,427	0,399
tubo 10 - 10^{-10} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,415	0,392
tubo 9 - 10^{-9} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,462	0,432
tubo 8 - 10^{-8} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,463	0,448
tubo 7 - 10^{-7} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,439	0,433
tubo 6 - 10^{-6} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,449	0,435
tubo 5 - 10^{-5} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,452	0,447
tubo 4 - 10^{-4} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,438	0,44
tubo 3 - 10^{-3} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,427	0,413
tubo 2 - 10^{-2} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,343	0,346
tubo 1 - 10^{-1} - ZnO + EGB + Meio + alíquota inóculo	0,307	0,342
Tubo 0 - controle: ZnO + EGB + Meio	NULO	NULO

10. ANEXOS



EXTRATO GLICÓLICO DE BANANA (HG) *Musa paradisíaca L./ Musáceas* Parte Utilizada: Fruto

PRINCÍPIOS ATIVOS

Contém substâncias graxas azotadas, além de pectina, açúcares, taninos, carboidratos e proteínas. Também possui sais minerais como o cálcio e o potássio, e vitaminas (A, B1, B2, C e E).

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

Possui alto valor nutritivo, contudo sua ação é determinada pelos taninos e vitaminas e sais minerais, auxiliando na adstringência da pele e couro cabeludo diminuindo a oleosidade, proporcionando maior suavidade e maciez a pele e ao cabelo. Colabora na melhora da nutrição da pele, sendo indicado como auxiliar no tratamento de afecções de pele.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

Aparência:	Líquido Límpido
Cor:	Amarelo claro a castanho
Odor:	Característico
pH (sol. 10%, 25° C)*:	4,00 – 6,00
Densidade(25° C)*:	1,000 – 1,100 g/cm ³
Solubilidade:	Solúvel em propilenoglicol, sorbitol, glicerina, água e etanol
Contagem Total bactérias:	Max. 100 UFC/g
Bolores e Leveduras:	Max. 100 UFC/g
Patogênicos:	Ausente

(*) Análises de aprovação pelo laboratório de CQ Mapric.

DOSAGEM

Em cremes, géis e loções - 1 a 5%. Em shampoos, condicionadores e sabonetes - 1 a 8%.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação. Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cravo, A.B. 'Frutas e Ervas que Curam – Panacéia Vegetal'. 3ª ed. Ed, Helmus.
- 2- Cruz, G.L., Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Ed. Civilização Brasileira, 1985.
- 3- Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.
- 4- Revilla, J. ; Apontamentos para a Cosmética Amazônica. Sebrae-INPA, 2002.