

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

RAFAEL SAULO SANTOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FRENTE A
CEPAS PRESENTES NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS**

**MANAUS
2009**

RAFAEL SAULO SANTOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FRENTE A
CEPAS PRESENTES NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade” e na linha de pesquisa “Princípios Bioativos Pró-saúde em Recursos Naturais”.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

**MANAUS
2009**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B238a Barbosa, Rafael Saulo Santos
Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos de
fungos endofíticos frente a cepas presentes nas infecções
endodônticas / Rafael Saulo Santos Barbosa. 2009
58 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ângela Delfina Bittencourt Garrido
Coorientadora: Antônia Queiroz Lima de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Endodontia. 2. Fungos endofíticos. 3. Plantas amazônicas. 4.
Victoria amazonica (Vitória Régia). I. Garrido, Ângela Delfina
Bittencourt II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RAFAEL SAULO SANTOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS FRENTE A CEPAS PRESENTES NAS
INFECÇÕES ENDODÔNTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade” e na linha de pesquisa “Princípios Bioativos Pró-saúde em Recursos Naturais”.

Apresentada e aprovada em 25 de Junho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido (Presidente)
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. José Odair Pereira (Membro Interno)
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (Membro Externo)
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Dedicatória

Ao meu pai **Evandro Brandão Barbosa**, meu exemplo de vida e dedicação à educação. Por ter se esforçado tanto para me formar um homem de bem, por se manter tão dedicado à vida acadêmica, por ter se tornado mestre em educação após os 40 anos e por me ensinar a aproveitar as boas oportunidades da vida. Tenho orgulho do que sou e, principalmente, orgulho de quem me tornei por sua causa. Esse trabalho é dedicado a você!

À minha mãe **Maria Lícia Santos Barbosa**, meu porto seguro e fonte de todo amor familiar. Por optar em estar sempre presente em nossas vidas, por me ensinar a assumir as conseqüências das minhas escolhas, por voltar a viver e estudar após os 45 anos, por entender da vida como poucos e por merecer um título de doutora sem ter cursado uma faculdade. Amo você e cada vez me interessa mais em ouvir os seus conselhos. Sem sua presença esse trabalho não seria possível!

Ao meu irmão **Danilo Egle Santos Barbosa**, meu apoio e meu escudo na infância. Por ser corajoso e criativo, por ter a humildade de querer sempre aprender, pelos momentos de conversa e desabafo, pelas vitórias e sucessos que servem de inspiração. Obrigado por dividir comigo minhas angústias e incertezas. Apesar da distância durante a realização desse projeto você sempre esteve presente em meus pensamentos e orações. Isso também é seu!

À minha namorada **Joyce de Figueiredo Meira**, mulher linda que amo e admiro. Por estar ao meu lado desde a graduação, por escutar meus anseios da juventude, por sempre me ajudar e apoiar quando preciso, pela imensa compreensão, pelo amor dedicado a mim, por enfrentar dificuldades passadas, presentes e com certeza futuras ao meu lado. Minha alma, nesse e em outros mundos, sempre estará ligada a sua. Essa vitória é nossa!

A todas as pessoas da minha família, em especial às tias **Hermínia, Evanilda e Valdelice**, ao primo **Maurício**, e a avó **Lourdes**. Por terem vindo de tão longe para assistir a finalização desse trabalho, por torcerem pela minha vitória e pelos carinhos dedicados na minha infância. Para que sirva de exemplo a todos os jovens de nossa família. O sucesso é possível e a educação imprescindível!

Agradecimentos

À minha orientadora **Prof. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido** por ter acreditado no sonho desse mestrado e pela disponibilidade para orientação.

Ao **Prof. Dr. José Odair Pereira** por ter aceitado a idéia de realização desse trabalho e pelo apoio durante a realização do mesmo.

À **Prof. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza** por toda ajuda durante a realização do trabalho, pelos ensinamentos passados, pelas sugestões dadas e pela disponibilidade em todos os momentos que precisei.

Ao **Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza** pela ajuda para liberação dos extratos, com os materiais de consumo e permanentes, sem os quais não teria sido possível a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Emílio Carlos Sponchiado Júnior** pelas sugestões durante o exame de qualificação.

Aos novos amigos **Laryssa, Auricélia, Eliana, Mayanne, Fabiana, Hector, Dácio, Adriana, Alessandra, Edson, Priscila, Roberto e Gabi** por todos os ensinamentos e momentos alegres nos laboratórios de pesquisa.

Aos amigos da turma de mestrado, **Lígia, Eliane e Francielle**, pela ajuda nas dificuldades das disciplinas e pelo apoio durante a realização da fase laboratorial.

À **Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**, pela compreensão e apoio.

Aos **Mestres e Doutores da UEA** que fizeram parte da minha vida acadêmica, pelos incentivos constantes.

A todos os que realizam trabalhos de pesquisa no laboratório de genética, laboratório de química e laboratório de produtos bioativos de origem microbiana da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Às amigas **Agilana, Ariadne e Marina** que mesmo distantes me motivam a ir cada vez mais longe profissionalmente.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa que foi fundamental para minha continuidade nas atividades no mestrado

RESUMO

A persistência de bactérias dentro do sistema de canais radiculares, após o preparo químico-mecânico tem sido considerada o fato etiológico principal da manutenção ou aparecimento de lesões refratárias. A biodiversidade de fungos endofíticos presentes na Amazônia Brasileira pode ser fonte natural de novos antibióticos para controle de microrganismos na Endodontia. Este trabalho avaliou 101 extratos de fungos endofíticos isolados de plantas amazônicas como *Victoria amazonica*, *Rollinia* sp. e *Duguetia stelechantha* quanto ao potencial antibiótico frente a cepas endodônticas. Foram testados, por meio do teste de difusão em ágar, extratos na concentração de 2 mg/mL contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, utilizando o programa Epi-Info 3.5.1. Observou-se formação de halo de inibição para 18 extratos de *V. amazonica*. Não foi observado resultado positivo para os extratos de *Rollinia* sp. e *D. stelechantha*. Doze extratos foram positivos para *S. aureus* sendo a maior média de halos de 14 mm, sem diferença estatística entre as médias ($p = 0,986$). Seis extratos inibiram o crescimento de *S. mutans* sendo a maior média de 14 mm, com diferença estatística ($p = 0,012$). Dois extratos inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* com média de 18 mm, sem diferença estatística ($p = 0,998$). Nenhum extrato foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis* e *C. albicans*. Não houve diferença entre os tamanhos dos halos nos tempos de 24, 48 ou 72 horas. Os 18 extratos de *V. amazonica* e 4 frações foram submetidos a autobiografia, a qual mostrou resultado positivo para um extrato frente a *S. mutans* e um extrato para *P. aeruginosa*. Das frações testadas três apresentam atividade frente a *P. aeruginosa*. Para os 2 extratos e 3 frações cujos resultados foram positivos foi realizado o teste para determinação da concentração inibitória mínima (MID). O MID da fração TC4 foi de 250 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. aeruginosa*. O estudo revelou que existe um potencial a ser explorado dentro da diversidade de fungos endofíticos que podem ser encontrados na região amazônica. Estudos complementares com extratos dos fungos endofíticos de *V. amazonica* devem ser realizados na tentativa da caracterização de uma substância pura.

Palavras chave: Endodontia, Fungos Endofíticos, Plantas da Amazônia.

ABSTRACT

The persistence of bacteria inside the root canal system after the chemical-mechanical preparation has been considered the main etiological cause of maintenance or appearance of refractory lesions. Biodiversity of endophytic fungi in the Brazilian Amazon may be natural source of new antibiotics to control microorganisms in Endodontics. This study evaluated 101 extracts from endophytic fungi isolated from Amazon plants such as *Victoria amazonica*, *Rollinia sp.* and *Duguetia stelechantha* about potential antibiotic against endodontic strains. Were tested by the agar diffusion method, extracts the concentration of 2 mg/ml against strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. The results were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test, using Epi-Info 3.5.1. There was formation of halo of inhibition to 18 extracts of *V. amazonica*. There were no positive results to the extracts of *Rollinia sp.* and *D. stelechantha*. Twelve extracts were positive for *S. aureus* with the highest average of 14 mm, with no statistical difference between means ($p = 0.986$). Six extracts inhibited the growth of *S. mutans* and the best average of 14 mm, with statistical difference ($p = 0.012$). Two extracts inhibited the growth of *P. aeruginosa* with an average of 18 mm, with no statistical difference ($p = 0.998$). No extract was able to inhibit the growth of *E. faecalis* and *C. albicans*. There was no difference between the sizes of halos in the times of 24, 48 or 72 hours. The 18 extracts of *V. amazonica* and 4 fractions were subjected to autography, which showed positive result for one extract against *S. mutans* and one extract for *P. aeruginosa*. Three fractions showed activity against *P. aeruginosa*. For the 2 extracts and 3 fractions with positive results was conducted the test for determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The fraction TC4 (ActoEt / MeOH 1: 1) showed activity of 250 $\mu\text{g/ml}$ against the *P. aeruginosa*. The study revealed that there is potential to be exploited within the diversity of endophytic fungi that can be found in the Amazon region. Additional studies with extracts of *V. amazonica* must be made in an attempt to obtain a pure substance.

Keywords: Endodontics, Endophytic Fungi, Amazon Plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Cepa de <i>S. mutans</i> reativada | 28 |
| Figura 2 | Preparação do Inóculo | 29 |
| Figura 3 | Semeadura das placas | 29 |
| Figura 4 | Semeadura dos poços | 30 |
| Figura 5 | Placa de elisa utilizada no ensaio MID | 32 |
| Figura 6 | Halo de inibição formado por VRTRB1 2.1a frente a <i>S. mutans</i> | 36 |
| Figura 7 | Autobiografia frente a <i>S. mutans</i> . Placa de CCD revelada (A) e placa de petri após corante (B) | 37 |
| Figura 8 | Autobiografia. Inibição de <i>P. aeruginosa</i> por VRC2 3.2 | 37 |
| Figura 9 | Placa 1 de MID para o <i>S. mutans</i> | 38 |
| Figura 10 | Placa 2 de MID para o <i>S. mutans</i> | 39 |
| Figura 11 | Ensaio de MID para <i>P. aeruginosa</i> | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Identificação dos extratos de <i>V. amazonica</i> | 25 |
| Tabela 2 | Identificação dos extratos de <i>Rollinia</i> sp. | 26 |
| Tabela 3 | Identificação dos extratos de <i>Duguetia stelechantha</i> | 27 |
| Tabela 4 | Valores médios dos halos de inibição para <i>S. aureus</i> | 34 |
| Tabela 5 | Valores médios dos halos de inibição para <i>P. aeruginosa</i> | 35 |
| Tabela 6 | Valores médios dos halos de inibição para <i>S. mutans</i> | 35 |
| Tabela 7 | Dosagem inibitória mínima para <i>S. mutans</i> | 40 |
| Tabela 8 | Dosagem inibitória mínima para <i>P. aeruginosa</i> | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain Heart-Infusion |
| µL | Microlitro |
| µg | Micrograma |
| mL | Mililitro |
| °C | Graus Celsius |
| CaOH₂ | Hidróxido de Cálcio |
| células/ml | Células por mililitro |
| MID | Dosagem Inibitória Mínima |
| MH | Mueller-Hinton |
| mm | Milímetros |
| CBAM | Coleção de Bactérias da Amazônia |
| CFAM | Coleção de Fungos da Amazônia |
| FIOCRUZ | Fundação Osvaldo Cruz |
| GEMA | Grupo de Estudos de Microrganismos da Amazônia |
| mg | Miligrama |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| m/V | Massa por Volume |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Infecções Endodônticas | 12 |
| 1.2 Medicação Intracanal e outros meios alternativos para desinfecção | 14 |
| 1.3 Microrganismos Endofíticos | 18 |
| 1.4 Extratos de Microrganismos Endofíticos Isolados de Plantas Amazônicas | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Geral | 22 |
| 2.2 Específicos | 22 |
| 3. METODOLOGIA | 23 |
| 3.1 Modelo de Estudo | 23 |
| 3.2 Obtenção das Cepas Padrão | 23 |
| 3.3 Obtenção de Extratos de Microrganismos Endofíticos | 23 |
| 3.3.1 <i>Victoria amazonica</i> | 24 |
| 3.3.2 <i>Rollinia</i> sp. | 26 |
| 3.3.3 <i>Duguetia stelechantha</i> | 27 |
| 3.4 Ensaio de Difusão em Ágar | 28 |
| 3.4.1 Reativação das Cepas | 28 |
| 3.4.2 Preparação do Inóculo | 28 |
| 3.4.3 Semeadura das Placas | 29 |
| 3.4.4 Aplicação dos Extratos | 30 |
| 3.4.5 Controle | 30 |
| 3.4.6 Leitura dos Halos de Inibição | 31 |
| 3.5 Autobiografia | 31 |
| 3.6 Ensaios para determinação da Dosagem Inibitória Mínima (MID) | 32 |
| 3.7 Análise Estatística | 33 |
| 4. RESULTADOS | 34 |
| 4.1 Teste de Difusão em Ágar | 34 |
| 4.2 Autobiografia | 36 |
| 4.3 Dosagem Inibitória Mínima (MID) | 38 |
| 5. DISCUSSÃO | 44 |
| 6. CONCLUSÕES | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

1. INTRODUÇÃO

A Endodontia é a ciência que envolve a etiologia, a prevenção, o diagnóstico e o tratamento das alterações patológicas da polpa dentária e de suas repercussões na região apical, periapical e conseqüentemente em todo o organismo (LEONARDO, 2005).

Embora existam diversos caminhos para as bactérias atingirem a polpa dentária, o modo mais freqüente é por meio da cárie, o que pode levar a inflamação e posteriormente a necrose da polpa. Com a evolução do processo, os produtos bacterianos decorrentes da necrose atingem os tecidos periapicais, levando a inflamação dos mesmos (SOARES; GOLDBERG, 2001).

Quando a polpa dentária encontra-se irreversivelmente inflamada ou em estado de necrose, cabe ao endodontista intervir no processo e realizar o tratamento do sistema de canais radiculares. Este tratamento consiste basicamente em acessar a cavidade pulpar, promover o esvaziamento e limpeza de todo o trajeto do sistema de canais radiculares e finalmente realizar um selamento mais hermético possível para impedir nova proliferação bacteriana.

De acordo com a literatura, quando o tratamento endodôntico é realizado de maneira correta, existe uma taxa de 80% a 90% de sucesso. Isso significa que existe uma taxa de 10% a 20% de insucesso, onde o tratamento local não foi eficiente; esta porcentagem está na maioria das vezes relacionada à presença de microrganismos em sítios extrarradiculares ou a algum tipo de microrganismo que não é comumente encontrado nas infecções endodônticas (SIQUEIRA-JR; LOPES, 2001; SUNDE et al., 2002; NAIR, 2006; VIVACQUA-GOMES, 2005).

1.1 Infecções Endodônticas

A presença de microrganismos no sistema de canais radiculares tem importante papel na etiologia das alterações pulpares e periapicais. A microbiota presente na boca saudável é diferente da microbiota presente nos casos de infecção endodôntica, que por sua vez difere daquela encontrada em casos de lesões resistentes ao tratamento endodôntico (SJÖGREN et al., 1997; SUNDE et al., 2002; ESTRELA et al., 2004; NAIR et al., 2005).

Noiri et al. (2002) consideram que a causa da existência de lesões resistentes ao tratamento endodôntico (refratárias) é a presença de bactérias e de produtos de seu metabolismo que permanecem dentro do sistema de canais radiculares. Os microrganismos podem infectar, através do forame apical, a região extrarradicular formando o biofilme bacteriano, tornando-se causa de lesões refratárias e de periodontite apical crônica.

Cheung; Ho (2001) confirmaram a presença de microrganismos em 67% dos 18 casos de lesões resistentes, com período mínimo de 4 anos após tratamento endodôntico; sendo predominantes *Streptococcus* e *Pseudomonas* spp.

Chu et al. (2006) observaram 36,6% de canais infectados após instrumentação e utilização de medicação intracanal durante 7 dias. Das 88 espécies de bactérias encontradas, 35,2% eram anaeróbias obrigatórias e 56,8% facultativas. O gênero mais comum foi *Streptococcus* (13/88) seguido de Actinomicetos (12/88), e *Neisseriaceae* (11/88). Foram coletadas amostras antes e depois da instrumentação, alguns canais apresentavam, no momento da segunda amostra, presença de bactérias não relatadas na primeira. Este fato contribui para a comprovação que ocorre contaminação bacteriana durante a instrumentação, sendo este o motivo pelo qual a microbiota em dentes tratados endodonticamente é diferente daquela em dentes com polpa necrosada, nos quais não foi realizado tratamento endodôntico.

Estudando 36 lesões refratárias, Sunde et al. (2002) constataram a presença de microrganismos como *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*,

Enterococcus, *Enterobacter* ou *Candida* em 75% das lesões. Em 25% das lesões estudadas foi verificada a presença de grânulos de enxofre. As amostras dos grânulos apresentaram crescimento de *Actinomyces israelii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* e *A. meyeri*.

O *Enterococcus faecalis*, uma bactéria facultativa gram-positiva, é considerada uma das espécies mais resistentes encontradas em infecções do sistema de canais radiculares (GOMES et al., 2001). Esta bactéria possui baixa susceptibilidade a soluções irrigadoras utilizadas no tratamento endodôntico (VIANNA et al., 2004), além de resistir a medicações intracanal como o hidróxido de cálcio (SIQUEIRA; UZEDA, 1998; VALERA et al., 2001; MENEZES et al., 2004).

Dentre as bactérias encontradas em lesões refratárias, *E. faecalis* é sem dúvida a mais comumente isolada devido a sua virulência, sendo, muitas vezes a única espécie de bactéria presente (DAHLÈN et al., 2000). Vários fatores aumentam a virulência dessa espécie de *Enterococcus* como a grande capacidade de aderência às células hospedeiras (adesinas de superfície), expressão de proteínas para aumentar a taxa de sobrevivência em ambientes com baixa quantidade de nutrientes, a habilidade de competir com outras bactérias e alterar respostas do hospedeiro. Por fim, o *E. faecalis* ainda é capaz de adentrar nos túbulos dentinários utilizando o fluido presente como nutriente e adesão às fibras colágenas como mecanismo de resistência (LOVE, 2001).

A presença de fungos nas infecções endodônticas também está descrita na literatura; diversos estudos coletaram do interior do canal radicular, ou até mesmo da região periapical este tipo de microrganismo. A espécie mais encontrada é *Candida albicans*, sendo também considerado responsável pela permanência de lesões periapicais mesmo após o tratamento endodôntico (SEN et al., 1995; SUNDQVIST et al., 1998; FERGUSON et al., 2002). Segundo Siqueira; Sen (2004), a *C. albicans* possui diversos mecanismos que aumentam a sua virulência, dentre eles, capacidade de adaptação em meios adversos, capacidade de adesão a

superfícies (células hospedeiras e outras bactérias), produção de enzimas hidrolíticas, alteração de morfologia, formação de biofilme e imunomodulação da resposta do hospedeiro.

1.2 Medicação Intracanal e outros meios alternativos para desinfecção

Qualquer microrganismo presente na cavidade bucal pode adentrar no sistema de canais radiculares, participando assim da infecção endodôntica, porém por causa da interação entre os microrganismos e da variação de oxigênio, as bactérias encontradas nesse tipo de infecção pertencem há um grupo restrito, sendo elas anaeróbias obrigatórias e/ou facultativas (PORTENIER et al., 2003; SUNDQVIST; FIGDOR, 2003).

O preparo químico-mecânico, utilizando limas e soluções irrigadoras, durante o tratamento endodôntico, é uma das fases mais importantes da terapia. É fato que certa quantidade de microrganismos são capazes de sobreviver ao preparo químico-mecânico. Essas bactérias remanescentes crescem e multiplicam-se dentro do sistema de canais radiculares no intervalo entre uma sessão e outra. Por isso a utilização de uma medicação intracanal é indicada, na tentativa de eliminar ou reduzir a quantidade de bactérias remanescentes presentes no sistema de canais radiculares, mesmo após o preparo químico-mecânico.

O hidróxido de cálcio (CaOH_2) é uma base forte, obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio. Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio. Mesmo tendo sido introduzido por Herman, em 1920, até hoje é a medicação intracanal mais utilizada na Endodontia (ESTRELA; HOLLAND, 2003). As principais propriedades do hidróxido de cálcio, biocompatibilidade e ação antimicrobiana, justificam sua utilização.

Somado a isso, o hidróxido de cálcio possui uma ação indutora de mineralização, capacidade de alterar o pH do meio, funciona como barreira física entre outras (MENEZES et al., 2004). Sua ação antimicrobiana dá-se pela influência da alteração do pH no crescimento,

metabolismo e divisão celular das bactérias (ESTRELA et al., 2001a). Sua aplicação como medicação intracanal está quase sempre associada ao uso de veículos, facilitando a sua inserção no sistema de canais radiculares.

Consta na literatura a utilização do hidróxido de cálcio associado a veículos como o soro fisiológico, anestésico, polietileno glicol 400, propileno glicol, glicerina, paramonoclorofenol canforado e outros (DISTEL et al., 2002; CARNEIRO et al., 2005; DOTTO et al., 2006). Os estudos divergem quanto ao fato do veículo influenciar ou não nas propriedades do hidróxido de cálcio, assim como no tempo de liberação e interação do produto com o meio (GOMES et al., 2002; ESTRELA et al., 2004; FACHIN et al., 2006).

Estudos *in vitro* como o de Hems et al. (2005); Vianna et al. (2005); Gurgel-Filho et al. (2007) têm comprovado a eficiência antimicrobiana do hidróxido de cálcio contra diversas bactérias como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*. E até mesmo contra espécies fúngicas como a *Candida Albicans*. Outro estudo, conduzido por Estrela et al. (2004), verificou atividade sobre cepas de *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*.

Mesmo com a sua excelente compatibilidade biológica e bom efeito antimicrobiano, o hidróxido de cálcio não pode ser considerado uma medicação intracanal ideal. Sua ação depende da dissociação de íons hidroxila e isto está diretamente ligado a alta solubilidade deste material, que pode variar dependendo do meio onde está sendo inserido. Este material também não apresenta boa radiopacidade, é de difícil inserção e ainda não se sabe o tempo exato para que obtenha o seu efeito pleno (ESTRELA et al., 2001a; GOMES et al., 2002).

Além do hidróxido de cálcio, outras substâncias são indicadas como medicação intracanal. Como por exemplo, o paramonoclorofenol canforado (PMCC), tricresol formalina, clorexidina e também associações de corticóide e antibióticos (HAUMAN; LOVE, 2003; DOTTO et al., 2006).

Ferguson et al. (2002) realizaram teste *in vitro* para verificar a capacidade de inibir o crescimento da *Candida albicans*. A clorexidina e o paramonoclorofenol canforado foram capazes de evitar o crescimento desse fungo, porém o hidróxido de cálcio associado a um veículo aquoso não foi eficaz.

Utilizando dentes extraídos, Ercan et al. (2006) compararam a clorexidina 2% em gel, clorexidina 2% com hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio com água destilada. Os dentes foram infectados com cepas de *E. faecalis* e *Candida albicans*. A clorexidina 2% apresentou melhor resultado.

Apesar dos resultados positivos em estudos *in vitro*, os compostos fenólicos e seus derivados (paramonoclorofenol e cresol) prejudicam componentes celulares indiscriminadamente e podem causar necrose tecidual por contato. Estes compostos são irritantes e altamente tóxicos. Mesmo quando acrescidos de componentes como a cânfora (paramonoclorofenol canforado) ou fomaldeído (formocresol), essas medicações apresentam alta toxicidade e limitada efetividade clínica. Por isso, esses compostos são contra indicados para serem utilizados isoladamente como medicação intracanal (HAUMAN; LOVE et al., 2003).

Como foi demonstrado, as medicações intracanal disponíveis atualmente apresentam desvantagens e ineficiência em certas propriedades, o que leva a busca por novos medicamentos e/ou recursos que possam ser utilizado para eliminar microrganismos.

O ozônio vem sendo estudado com relação a sua capacidade antimicrobiana, pois é comumente utilizado na indústria com essa finalidade. Estudos como os de Nagayoshi et al. (2004) e Hems et al. (2005) encontraram *in vitro* atividade bactericida frente ao *E. faecalis*; fato que não foi confirmado no estudo de Estrela et al. (2007), utilizando água com ozônio e ozônio na forma de gás durante 20 minutos no canal radicular de dentes extraídos.

O laser também tem a capacidade de auxiliar no tratamento endodôntico (STABHOLZ et al., 2004). Vários tipos de laser são testados quanto a sua capacidade de desinfecção, como por exemplo, o laser de Er:YAG, Ho:YAG, Nd:YAG, Nd:YAP, de Diodo e outros. Apesar de possuir ação bactericida variada, o laser apresenta desvantagem quanto a sua utilização, pois se propaga em linha reta o que dificulta sua utilização no sistema de canais radiculares, assim como o fato de proporcionar aquecimento da região onde está sendo aplicado, o que pode causar danos aos tecidos periodontais (SEAL et al., 2002; BERGMANS et al., 2006; ELDENIZ et al., 2007).

Segundo Ishizaki et al. (2004) o laser de Er,Cr:YSGG possui pontas flexíveis e de diâmetros variados para aplicação, causa mínima elevação de temperatura durante irradiação. Este laser foi testado em relação à capacidade antimicrobiana frente à cepa de *E. faecalis* comparado com o hipoclorito de sódio. O Er,Cr:YSGG foi capaz de causar uma redução microbiana porém não eliminou a bactéria do canal radicular, enquanto o hipoclorito de sódio a 3% inibiu efetivamente o crescimento do *E. faecalis*.

Os fitoterápicos já fazem parte da realidade dos estudos para sua aplicação na Odontologia. Weyne et al. (2003) avaliaram clinicamente a utilização de dois enxaguatórios bucais, Malvatricin® e Flogoral®. O primeiro, originado da Malva, planta herbácea encontrada no continente africano, europeu e americano, apresentou melhores resultados na redução do índice de biofilme e índice gengival.

A própolis, substância complexa produzida pelas abelhas, tem se mostrado eficiente contra bactérias presentes no biofilme dental e na cárie dentária (BANKOVA, 2005). O mesmo tem sido verificado para a romã, planta da família das Punicáceas, com ação bactericida e bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas constituintes do biofilme dental (PEREIRA et al., 2005b).

Assim como em outras áreas da Odontologia, os fitoterápicos também têm sido testados contra patógenos endodônticos. Como é o caso do trabalho de Pereira et al. (2005a) com a *Arctium lappa*, planta trazida do Japão, também cultivada no Brasil. Extratos contendo ativos da planta apresentaram atividade sobre *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. mutans*.

Abnader (2005) avaliou a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a vários veículos, entre eles o óleo resina de copaíba. O estudo utilizou 16 grupos experimentais em períodos de 24, 48 e 72 horas. Foi utilizado o teste de difusão em ágar e de diluição em meio líquido, sendo observado resultado positivo frente a *C. albicans* e *E. faecalis*. A *Copaífera multijuga* foi estudada ainda por Garrido et al. (2006) que observaram atividade antimicrobiana frente a cepas endodônticas.

Uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata*, foi proposta por Sponchiado-Jr (2006), a mesma apresentou efetividade antimicrobiana contra o *E. faecalis* nos períodos de 7, 14 e 28 dias.

Existe, portanto, uma diversidade de estudos avaliando a capacidade antimicrobiana das mais diversas medicações intracanal, assim como das misturas e associações; várias são as metodologias utilizadas e resultados encontrados. Os estudos *in vitro* são o início da busca de uma medicação intracanal com efetividade antimicrobiana, podendo esta ser a primeira etapa para uma medicação intracanal promissora na Endodontia..

1.3 Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízo ao seu hospedeiro (AZEVEDO et al., 2000). A relação entre endófito e planta ainda está sendo estudada, mas se sabe que uma de suas funções é promover proteção à planta, pela produção de substâncias com ações antimicrobianas. Alguns

compostos bioativos produzidos pelos endófitos têm importância na medicina, porque possuem atividade antifúngica, antibacteriana e outras atividades biológicas (STROBEL, 2003).

Uma das maiores contribuições dos endofíticos para a medicina foi a descoberta de um fungo endofítico, *Taxomyces andreanae*, endófito de *Taxus brevifolia*, capaz de produzir o Taxol, composto que apresenta atividade anticâncer, utilizado em doenças que provocam proliferação tecidual em humanos. *Pseudomonas viridiflava*, também endofítico, é capaz de produzir um composto bioativo com reconhecida atividade antifúngica contra patógenos humanos como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (STROBEL; DAISY, 2003).

Strobel et al. (2001) descreveram um fungo endofítico de *Cinnamomum zeylanicum* encontrado em florestas da América Central. O fungo *Muscodor albus* é capaz de produzir compostos voláteis com atividade bactericida e fungicida. Este estudo foi pioneiro em relação a atividades voláteis dos endofíticos. *M. albus* apresentou atividade *in vitro* contra cepas de *Escherichia coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e outros. Partindo desse estudo, outros estão sendo conduzidos para desenvolver um produto a ser usado na agricultura como uma espécie de borrifador para evitar contaminação de plantas, frutas e solo.

Continuando as pesquisas desse gênero de fungo, Daisy et al. (2002) isolaram da *Paullina paullinoides*, encontrada na Amazônia Peruana, o *Muscodor vitigenus*. Este endofítico também produz compostos voláteis; um dos quais foi identificado como sendo similar à naftalina, tendo por isso a propriedade de alterar o comportamento dos insetos, servindo como repelente.

Em trabalho realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Lima (2007) verificou a atividade de fungos endofíticos, isolados de *Piper aduncun* L. sobre o *Mycobacterium tuberculosis*. Foi verificado um fungo endofítico que em vez de inibir, acelera

o crescimento do *M. tuberculosis*, configurando uma esperança para o desenvolvimento de um produto biotecnológico contendo ativos do fungo como ferramenta de um novo teste diagnóstico para tuberculose.

Souza et al. (2004) isolaram 571 fungos endofíticos de *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogen*, duas plantas tóxicas da Amazônia relacionadas à morte de gados na região. Em ensaios realizados, os autores verificaram atividade antimicrobiana de alguns extratos dos fungos frente a cepas de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *A. flavus* e *Bacillus* sp.

Dentre as principais atividades biológicas encontradas nos endofíticos, estão os metabólitos com efeito antibiótico, antitumor, antiinflamatório, antioxidante e anticâncer (HUANG et al., 2001; FIRAKOVA et al., 2007).

1.4 Extratos de Microrganismos Endofíticos Isolados de Plantas Amazônicas

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica, a maior do planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica Amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004).

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) vem desenvolvendo trabalhos de pesquisa voltados para o isolamento, identificação de microrganismos endofíticos e produção de extratos com o objetivo de realizar testes microbiológicos. Existem disponíveis no momento extratos brutos de meio líquido fermentado e do micélio de fungos endofíticos de plantas medicinais e aquáticas da Amazônia (COSTA et al. 2008; SOUZA et al. 2008).

A *Victoria amazonica* é uma planta macrófita aquática, oriunda da região Amazônica, comumente conhecida como Vitória Régia, da qual foram isolados diversos fungos e bactérias, entre eles alguns actinomicetos. Existem poucos trabalhos sobre propriedades

medicinais da *V. amazonica*, mas Pott; Pott (2000) relataram atividade depurativa e cicatrizante.

A *Rollinia* sp. é uma planta da família *Annonaceae*, grupo de plantas típicas dos trópicos, nas quais estão incluídas a graviola e a fruta-do-conde. Desta planta, além de fungos e bactérias, foram isolados também actinomicetos do gênero *Frankia*. Essa bactéria tem importante papel para a planta hospedeira, pois é uma das responsáveis pela absorção do nitrogênio atmosférico, através da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e produção de antibióticos.

A partir de *Duguetia stelechantha*, também pertencente a família *Annonaceae*, foram isolados fungos e bactérias. Dentre os actinomicetos presentes, foram encontrados alguns do gênero *Streptomyces*, o qual é reconhecidamente produtor de antibióticos do mercado mundial. Conforme Castilho et al. (2002), esse gênero é responsável pela produção da munumbicina D, composto bioativo com atividade antimalárica, assim como a cacadumicina A com efeito antimalárico e antibiótico (CASTILHO et al., 2003). Erza et al. (2004) relataram à produção do composto químico coronamicina apresentando atividade antifúngica e antimalárica para o *Streptomyces*.

Realizar a busca, isolamento e testes laboratoriais voltados ao estudo dos endofíticos disponíveis na variedade vegetal presente na Região Amazônica, apresenta-se como linha de raciocínio para descoberta de novos produtos de interesse para a Medicina, Odontologia e qualquer área das ciências da saúde. A atividade antimicrobiana já descrita na literatura foi ponto inicial para o interesse no estudo *in vitro* da ação dos endófitos de plantas Amazônicas frente as cepas presentes nas infecções endodônticas resistentes. Ainda pode ser adicionado o fato de que voltar as pesquisas para o campo dos endófitos abre margem para um recurso que pode ser controlado e reproduzido.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos, isolados de plantas da Amazônia, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans*.

2.2 Específicos

- Verificar dentre os extratos disponíveis quais possuem atividade antimicrobiana frente às cepas testadas.
- Verificar quais extratos de fungos endofíticos possuem maior atividade sobre a cepa do *Enterococcus faecalis*.
- Verificar a Dosagem Inibitória Mínima (MID) para os extratos de fungos endofíticos que apresentarem melhores resultados.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

Realizou-se de um estudo experimental para avaliar a atividade antimicrobiana de 101 extratos de fungos endofíticos, isolados de plantas Amazônicas frente às cepas padrão: *Staphylococcus aureus* (CBAM 026), *Streptococcus mutans* (CBAM 289), *Enterococcus faecalis* (CBAM 309), *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 024) e *Candida albicans* (CFAM 1132).

3.2 Obtenção das Cepas Padrão

Foram utilizadas quatro amostras de bactérias e uma levedura, obtidas da Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM) e da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) da Coleção Biológica da Fundação Osvaldo Cruz, Manaus, Amazonas (FIOCRUZ-AM).

3.3 Obtenção de Extratos de Microrganismos Endofíticos

Este estudo faz parte dos trabalhos realizados pelo Grupo de Estudos de Microrganismos da Amazônia (GEMA), o qual conta com a participação do Departamento de Química, Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual do Amazonas. O GEMA realiza estudos que incluem o isolamento, a identificação e a preservação de microrganismos endofíticos de plantas amazônicas, assim como obtenção dos extratos, frações de extratos e purificação de substâncias. De acordo com a disponibilidade dos trabalhos do GEMA foram utilizados extratos de três plantas. Na segunda fase do

trabalho, além de extratos foram utilizadas frações obtidas através de partições com hexano, acetato de etila e metanol.

Os extratos testados foram originados de meio líquido fermentado, cuja partição foi feita com acetato de etila e do micélio dos fungos endofíticos extraídos com etanol 100%. Os extratos foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.3.1 *Victoria amazonica*

Foi coletada em 31 de setembro de 2007, no município do Careiro da Várzea-AM. Foram obtidos, a partir da planta, diversos fungos e bactérias endofíticas isoladas. A relação dos extratos utilizados está disposta na tabela 1.

Tabela 1Identificação dos extratos de *V. amazonica*

| Ordem | Identificação do Extrato | Meio de Cultura | Origem | Solvente |
|--------------|---------------------------------|------------------------|---------------|-----------------|
| 1 | VRB2 2.2 | BDA | Micélio | Etanol |
| 2 | VRB2 2.2a | BDA | Micélio | Etanol |
| 3 | VRC1 2.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 4 | VRC2 2.2a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 5 | VRC2 2.2b | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 6 | VRC2 2.2c | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 7 | VRC2 3.2 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 8 | VRC2 3.2a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 9 | VRF1 1.1 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 10 | VRF1 2.2 | AVEIA | Micélio | Etanol |
| 11 | VRF1 2.2a | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 12 | VRF1 2.2b | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 13 | VRF1 2.3 | BDA | Micélio | Etanol |
| 14 | VRF1 2.3a | BDA | Micélio | Etanol |
| 15 | VRF1 2.3b | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 16 | VRF1 2.3c | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 17 | VRF1 2.3d | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 18 | VRF1 2.3e | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 19 | VRF2 1.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 20 | VRF2 1.1b | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 21 | VRF2 2.3 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 22 | VRF3 2.2a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 23 | VRF3 2.2b | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 24 | VRF3 2.2c | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 25 | VRTRB1 1.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 26 | VRTRB1 1.3a | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 27 | VRTRB1 1.3b | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 28 | VRTRB1 1.3c | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 29 | VRTRB1 1.3d | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 30 | VRTRB1 2.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 31 | VRTRB1 2.1a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 32 | VRTRB1 2.1b | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 33 | VRTRB1 2.1c | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 34 | VRTRB1 2.1d | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 35 | VRTRB1 2.1e | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 36 | VRTRB2 1.1 | BDA | Micélio | Etanol |
| 37 | VRTRB2 1.1a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 38 | VRTRB2 2.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 39 | VRTRB3 2.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 40 | VRTRB3 2.1a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 41 | VRTRB3 2.1b | BDA | Meio Líquido | Acetato |

3.3.2 *Rollinia* sp.

Foi coletada em 17 de outubro de 2007, no campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Também com diversos fungos e bactérias isoladas, entre elas actinomicetos do gênero *Frankia*. A relação dos extratos utilizados é apresentada na tabela 2.

Tabela 2

Identificação dos extratos de *Rollinia* sp.

| Ordem | Identificação do Extrato | Meio de Cultura | Origem | Solvente |
|--------------|---------------------------------|------------------------|---------------|-----------------|
| 42 | ANSPC1 3.3b | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 43 | ANSPC2 2.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 44 | ANSPC2 2.2a | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 45 | ANSPC2 3.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 46 | ANSPC2 3.1a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 47 | ANSPC3 1.2a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 48 | ANSPCC2 1.2 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 49 | ANSPCC2 2.2 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 50 | ANSPCC2 3.2 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 51 | ANSPCG1 1.3 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 52 | ANSPCG1 2.2 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 53 | ANSPCG2 1.2a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 54 | ANSPCG2 1.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 55 | ANSPCG2 2.2 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 56 | ANSPCR1 1.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 57 | ANSPCR2 1.2 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 58 | ANSPF2 2.3 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 59 | ANSPG1 2.2 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 60 | ANSPG1 2.3a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 61 | ANSPG2 1.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 62 | ANSPG2 1.1a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 63 | ANSPG2 2.1b | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 64 | ANSPR1 1.2 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 65 | ANSPR1 2.3b | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 66 | ANSPR2 1.1 | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 67 | ANSPR2 3.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 68 | ANSPR2 3.3g | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 69 | ANSPR3 1.2 | BDA | Meio Líquido | Acetato |

3.3.3 *Duguetia. stelechantha*

Foi coletada na Fazenda Experimental da UFAM, na estrada Manaus-Caracarái, no dia 21 de outubro de 2007. Foram isolados diversos fungos e bactérias, entre estas alguns actinomicetos do gênero *Streptomices*. A relação dos extratos é apresentada na tabela 3.

Tabela 3

Identificação dos extratos de *Duguetia* sp.

| Ordem | Identificação do Extrato | Meio de Cultura | Origem | Solvente |
|--------------|---------------------------------|------------------------|---------------|-----------------|
| 70 | DGC1 1.1 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 71 | DGC1 1.2 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 72 | DGC1 2.1b | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 73 | DGC1 2.3a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 74 | DGC2 1.2 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 75 | DGC2 1.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 76 | DGC2 1.3a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 77 | DGC2 2.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 78 | DGC2 2.3a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 79 | DGCC 1 1.3 | AVEIA | Micélio | Etanol |
| 80 | DGCC 1 1.3a | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 81 | DGCC2 1.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 82 | DGCC2 1.3a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 83 | DGCR1 2.1 | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 84 | DGCR2 2.1 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 85 | DGCR2 2.1a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 86 | DGCR2 2.1b | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 87 | DGCR2 3.1 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 88 | DGG1 2.1b | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 89 | DGG2 1.1 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 90 | DGG2 1.2 | BDA | Micélio | Etanol |
| 91 | DGG2 3.1 | AVEIA | Meio Líquido | Acetato |
| 92 | DGG2 3.1a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 93 | DGG2 3.2 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 94 | DGG2 3.2a | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 95 | DGG2 3.2b | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 96 | DGG2 3.2c | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 97 | DGG2 3.3 | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 98 | DGG2 3.3a | ISP2 | Meio Líquido | Acetato |
| 99 | DGG3 2.1 | ISP2 | Micélio | Etanol |
| 100 | DGG3 2.1a | BDA | Meio Líquido | Acetato |
| 101 | DGR2 2.1 | AVEIA | Micélio | Etanol |

3.4 Ensaio de Difusão em Ágar

3.4.1 Reativação das Cepas

Foram inoculadas em tubos rosqueáveis contendo aproximadamente 10 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) adicionado por meio de micropipetas graduadas. O crescimento dos microrganismos foi obtido a 37°C por um período de 18 a 24 horas.

Das amostras com crescimento bacteriano (turvas) foi retirado 50 µL, de cada amostra e semeadas em placas contendo meio de cultura *Ágar Mueller – Hinton*. O crescimento bacteriano foi obtido em fase exponencial. Todos os procedimentos testes foram realizados em condições assépticas em câmara de fluxo laminar (figura 1).

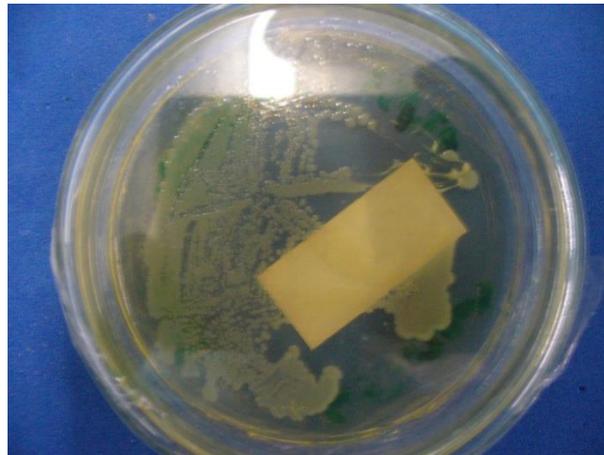


Figura 1 – Cepa de *S. mutans* reativada

3.4.2 Preparação do Inóculo

Após o crescimento em meio sólido, uma das colônias isoladas, foi transferida, em condições assépticas, para tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura *Mueller – Hinton*

(líquido), previamente esterilizado. O tubo foi incubado a uma temperatura de 37°C por 24 horas. A diluição do inóculo foi ajustada ao tubo 1 da escala de McFarland. (figura 2).

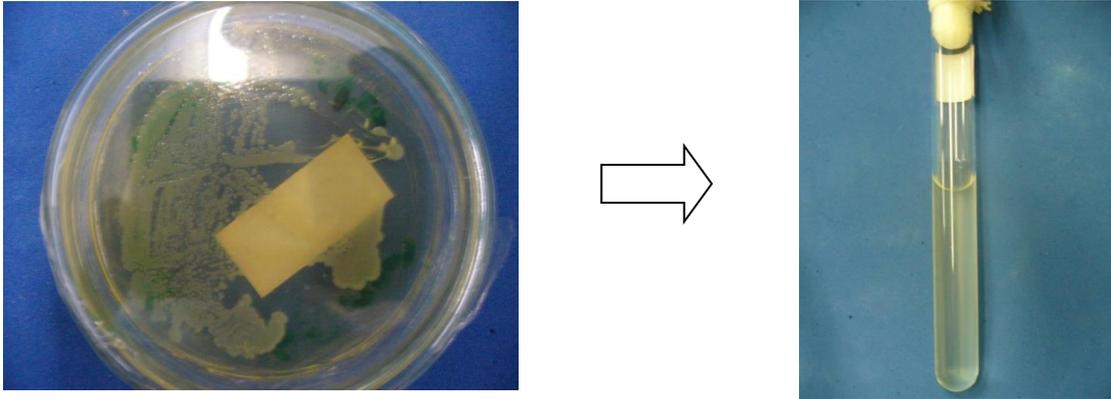


Figura 2 – Preparação do Inóculo

3.4.3 Semeadura das Placas – *Speed plate*

Nas placas de petri, contendo meio de cultura ágar BHI, foram semeadas as bactérias, em triplicata, com 100µL de cada suspensão experimental obtida. O procedimento foi realizado com o auxílio de uma alça de *drigalski* previamente esterilizada, a fim de obter-se um crescimento uniforme. Foram utilizadas placas medindo 15 cm de diâmetro e 2 cm de altura (figura 3).



Figura 3 – Semeadura das placas

3.4.4 Aplicação dos Extratos

Os extratos foram pesados (2 mg) e diluídos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 900 µl de água destilada, sendo utilizados na concentração de 2 mg/mL. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 2 horas, em condições assépticas para difusão dos

extratos. Em seguida foram incubadas por 24, 48 e 72 horas em uma estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C (figura 4). Foram confeccionados vinte e três orifícios, com auxílio de um tubo de vidro previamente esterilizado, com 5 mm de diâmetro e 7 mm de profundidade. Estes orifícios foram preenchidos com 100 µL dos extratos dos fungos endofíticos com auxílio de uma micropipeta. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.



Figura 4 – Aplicação dos extratos nos poços.

3.4.5 Controle

Para controle do crescimento bacteriano, o primeiro orifício foi preenchido com DMSO (solvente) e o último foi preenchido com água destilada.

3.4.6 Leitura dos Halos de Inibição

Os halos de inibição foram medidos depois de transcorrido o período de incubação de 24, 48 e 72 horas para cada microrganismo.

As leituras foram realizadas com auxílio de uma régua milimetrada, para determinação do diâmetro dos halos de inibição. As medidas foram tomadas tendo-se dois pontos de referência, sendo medida, a distância entre os pontos que delimitam a área de inibição de crescimento bacteriano e o início da região de crescimento microbiano, presente ao redor dos poços contendo os extratos.

3.5 Autobiografia

Os extratos que apresentaram formação de halo de inibição foram submetidos a autobiografia. Estes extratos e 4 frações foram aplicados sobre cromatoplasmas de sílica gel (MERK®) as quais foram submetidas ao sistema eluente Hexano/Acetato de etila/Acetona (5:4:1). Uma placa foi revelada com solução de vanilina sulfúrica, mistura 1:1, das soluções: 10% de ácido sulfúrico em etanol e 1% (m/V) de vanilina em etanol. Aplicando-se a solução na placa, aquece-se por 2 minutos a 110°C na chapa aquecedora..

As duplicatas das microplacas foram fixadas em uma placa de petri grande e recobertas com meio de cultura ágar BHI. A suspensão de células bacterianas (item 3.4.2) foi inoculada na placa e espalhada em sua superfície com auxílio da alça de *drigalski*. Após incubação de 24 horas a uma temperatura de 37°C as placas foram coradas com a solução de cloreto de tetrazole 1%, para leitura das zonas de inibição.

3.6 Ensaio para determinação da Dosagem Inibitória Mínima (MID)

Das bactérias crescidas para inóculo, conforme o item 3.4.2, foi retirada uma alíquota de 10 µL que é distribuída nos poços de uma placa de elisa (com 96 poços) contendo 100 µL de meio de cultura *Müeller – Hinton* líquido mais 100 µL dos extratos nas seguintes concentrações: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL para determinação da Dosagem Inibitória Mínima (MID). O ensaio foi realizado

em triplicata. A última fileira da placa serviu como controle positivo do crescimento bacteriano, na qual não foi colocado nenhum extrato. As três últimas colunas (10,11 e 12) foram utilizadas como controle negativo do crescimento, nestas foram distribuídos 100 μ L, nas mesmas concentrações dos extratos, de um antibiótico padrão, de acordo com a bactéria testada. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas. A figura 5 mostra de forma esquemática a distribuição dos poços na placa de elisa.

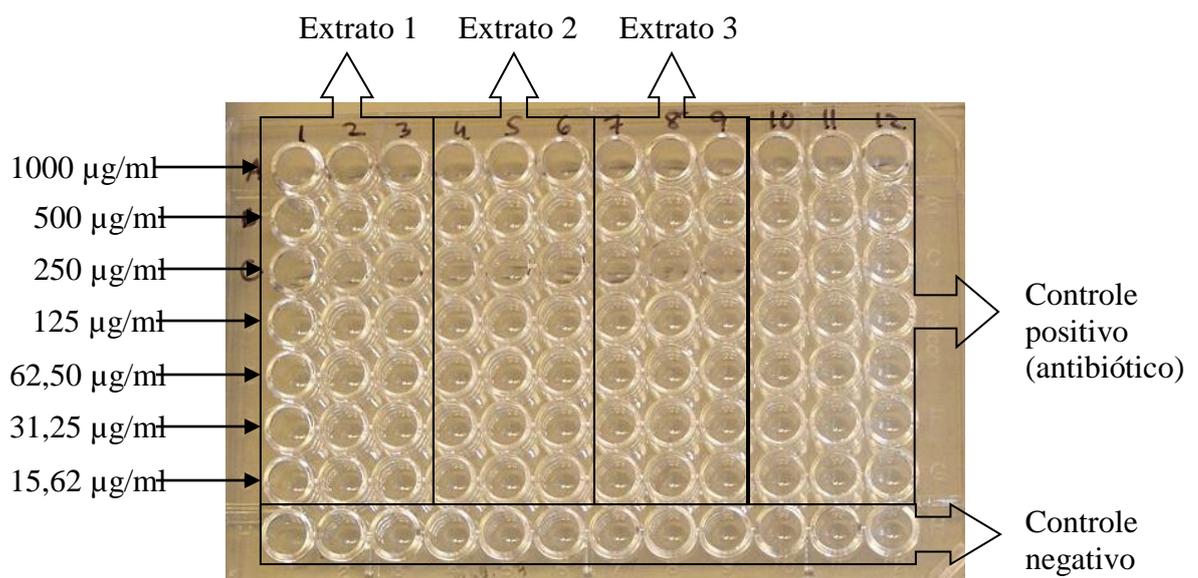


Figura 5 – Placa de elisa utilizada no ensaio MID

3.7 Análise Estatística

Na análise descritiva dos dados calculou-se a mediana, primeiro quartil (Q_1) e terceiro quartil (Q_3). Na comparação de mais de duas médias foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que na comparação de duas médias foi utilizado o teste de Mann-Whitney, pois os dados não se encontravam normalmente distribuídos.

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info 3.5.1 para o Windows, que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de Difusão em Ágar

Foram realizados testes em 101 extratos brutos do meio líquido fermentado e do micélio de fungos endofíticos isolados de *Rollinia* sp., *Victoria amazonica* e *Duguetia stelechantha*. Somente os extratos provenientes dos fungos endofíticos isolados de *V. amazonica* apresentaram atividade antimicrobiana. Não foi observada formação de halo para *E. faecalis* e *C. albicans*. Os resultados médios dos halos de inibição para os 18 extratos positivos foram divididos de acordo com o microrganismo e são apresentados nas tabelas 4, 5 e 6

Tabela 4

Valores dos halos de inibição para *S. aureus*

| Extratos | Mediana (mm) | Q ₁ – Q ₃ |
|-------------|--------------|---------------------------------|
| VRB2 2.2 | 0 | 0 – 12 |
| VRF1 2.2a | 0 | 0 – 20 |
| VRF1 2.2b | 0 | 0 – 14 |
| VRF1 2.3a | 0 | 0 – 14 |
| VRF1 2.3b | 12 | 0 – 18 |
| VRF1 2.3c | 0 | 0 – 14 |
| VRF3 2.2a | 0 | 0 – 14 |
| VRTRB1 1.3c | 0 | 0 – 12 |
| VRTRB1 2.1a | 0 | 0 – 16 |
| VRTRB1 2.1b | 14 | 0 – 16 |
| VRTRB2 1.1 | 0 | 0 – 12 |
| VRTRB3 2.1 | 0 | 0 – 14 |

p = 0,986 (Teste de Kruskal-Wallis).

Q₁ = Primeiro quartil (25%) e Q₃ = Terceiro quartil (75%).

Tabela 5Valores médios dos halos de inibição para *P. aeruginosa*

| Extratos | Mediana (mm) | Q₁ – Q₃ |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|
| VRC2 2.2 | 18,0 | 16 – 20 |
| VRC2 3.2 | 18,0 | 18 – 18 |

p = 0,998 (Teste de Mann-Whitney).

Q₁ = Primeiro quartil (25%) e Q₃ = Terceiro quartil (75%).**Tabela 6**Valores médios dos halos de inibição para *S. mutans*

| Extratos | Mediana (mm) | Q₁ – Q₃ |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|
| VRB2 2.2 | 12 | 12 – 12 |
| VRC2 3.2 | 14 | 12 – 14 |
| VRTRB1 1.3c | 10 | 0 – 10 |
| VRTRB1 2.1a | 14* | 14 – 16 |
| VRTRB1 2.1b | 12 | 12 – 12 |
| VRTRB2 1.1 | 12 | 10 – 12 |

p = 0,012 (Teste de Kruskal-Wallis). * Indica diferença estatística

Q₁ = Primeiro quartil (25%) e Q₃ = Terceiro quartil (75%).

Doze extratos apresentaram atividade frente a *S. aureus*. Dois extratos foram positivos para *P. aeruginosa* e seis para *S. mutans*. Um mesmo extrato (VRB2 2.2) apresentou atividade contra *S. aureus* e *S. mutans*, assim como o extrato VRC2 3.2 apresentou atividade contra *S. mutans* e *P. aeruginosa*.

O maior valor médio de acordo com o microrganismo testador foi 14 mm para VRTRB1 2.1b frente a *S. aureus* e também 14 mm para VRTRB1 2.1a frente a *S. mutans* (figura 6). Os extratos que foram positivos para *P. aeruginosa* (VRC2 2.2 e VRC2 3.2) apresentaram o halo de inibição de mesmo diâmetro (18 mm), não ocorrendo diferença estatística entre eles.

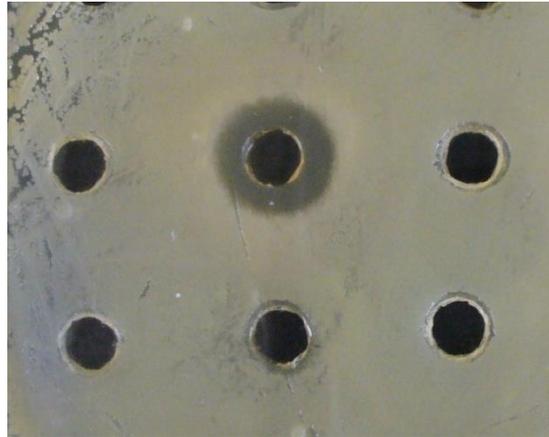


Figura 6 – Halo de inibição formado por VRTRB1 2.1a frente a *S. mutans*.

Não houve diferença estatística entre os extratos que inibiram *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentando p-valor de 0,986 e 0,998 respectivamente. Dentre os extratos que inibiram o crescimento de *S. mutans* foi observada diferença estatística para VRTRB1 2.1a (p-valor=0,012).

4.2 Autobiografia

Todos os extratos brutos que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de difusão em ágar foram submetidos a autobiografia. Foram testadas também 4 frações de VRC2 2.2: TC1, TC2, TC3, TC4. Dos 18 extratos brutos testados, dois apresentaram atividade positiva, sendo um para *S. mutans* e um para *P. aeruginosa*. Três frações de VRC2 2.2 apresentaram atividade contra *S. mutans*. Os testes foram realizados em triplicata e para melhor visualização dos resultados foi utilizada uma solução reveladora de cloreto de tetrazole 1 %.

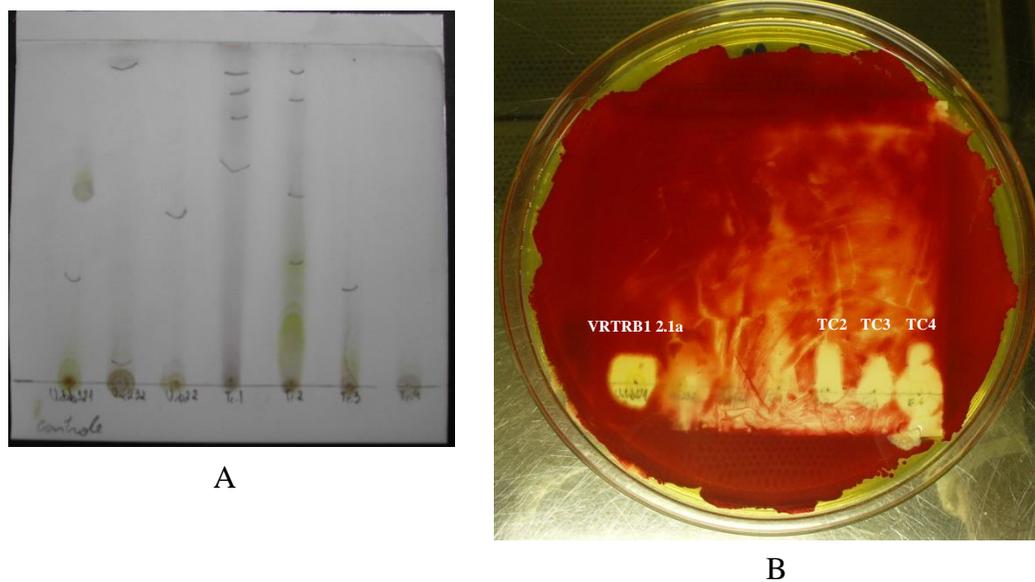


Figura 7 – Autobiografia frente a *S. mutans*. Placa de CCD revelada (A) e placa de petri após revelação (B).

O extrato que apresentou atividade frente a *S. mutans* foi VRTRB1 2.1a, assim como as frações TC2, TC3 e TC4 (figura 7). O extrato bruto que apresentou atividade frente a *P. aeruginosa* foi VRC2 3.2 (figura 8).

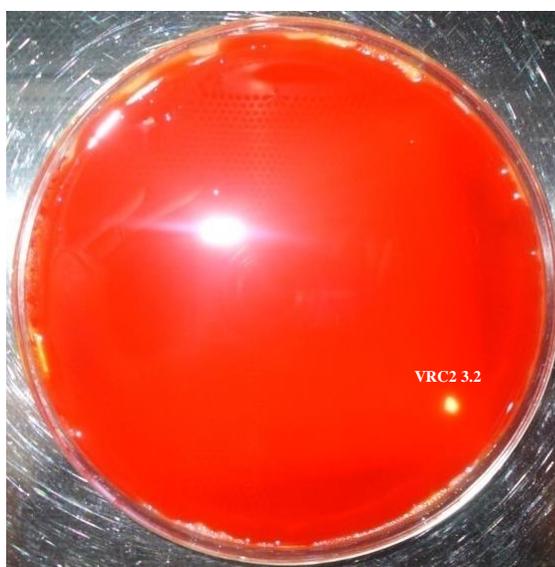


Figura 8 – Autobiografia. Inibição de *P. aeruginosa* por VRC2 3.2.

4.3 Dosagem Inibitória Mínima (MID)

Os extratos com resultado positivo no teste de autobiografia e na difusão em ágar foram submetidos a ensaio para determinação da dosagem inibitória mínima.

Para determinação da dosagem inibitória mínima relativa ao *S. mutans* foi realizado teste com dois extratos brutos (VRTRB1 2.1a e VRB2 2.2), e três frações de VRC2 2.2 (TC2, TC3 e TC4). Os resultados do teste podem ser visualizados nas figuras 9 e 10. Para melhor leitura, as placas foram reveladas com cloreto de tetrazole a 1%.

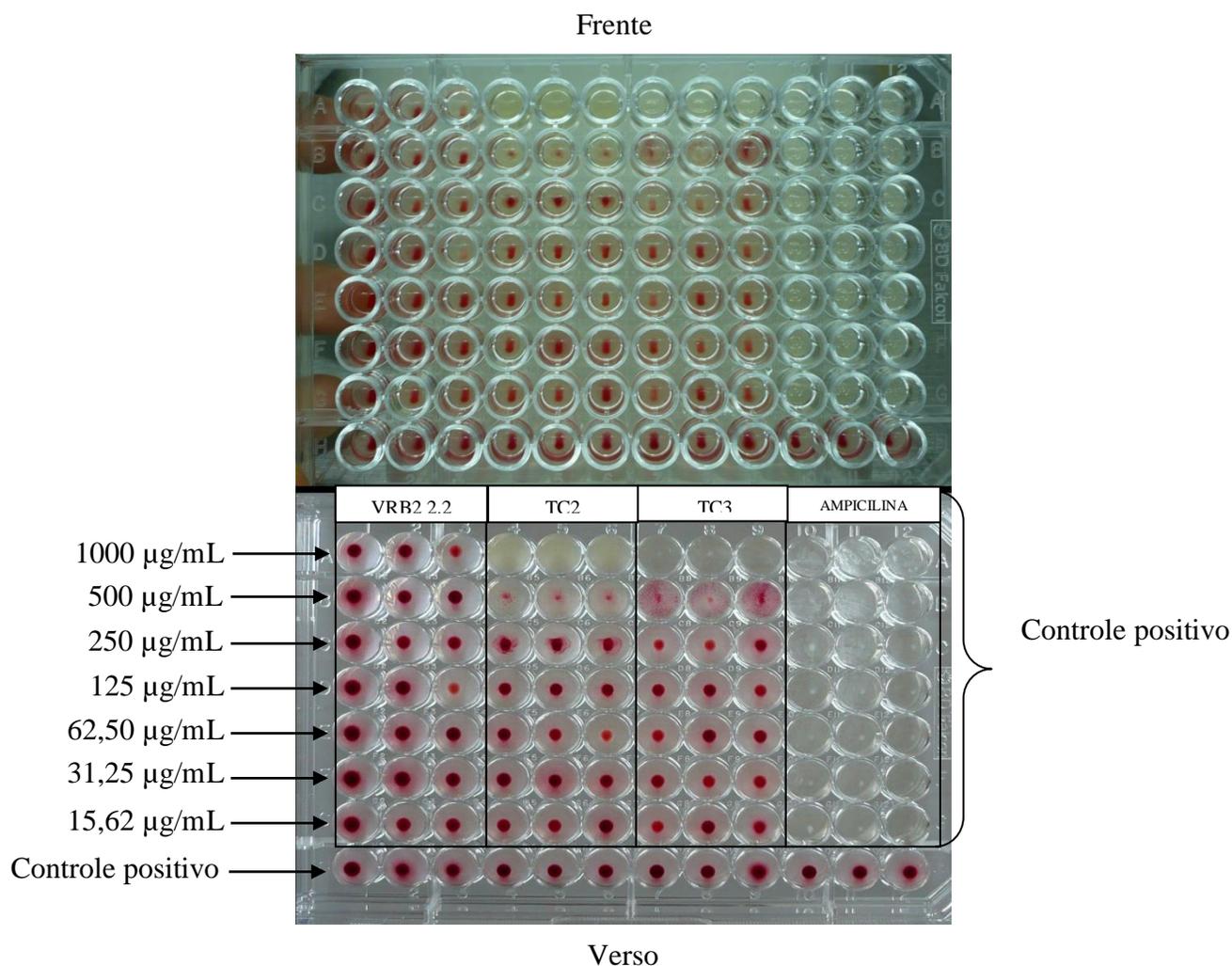


Figura 9 – Placa 1 de MID para o *S. mutans*.

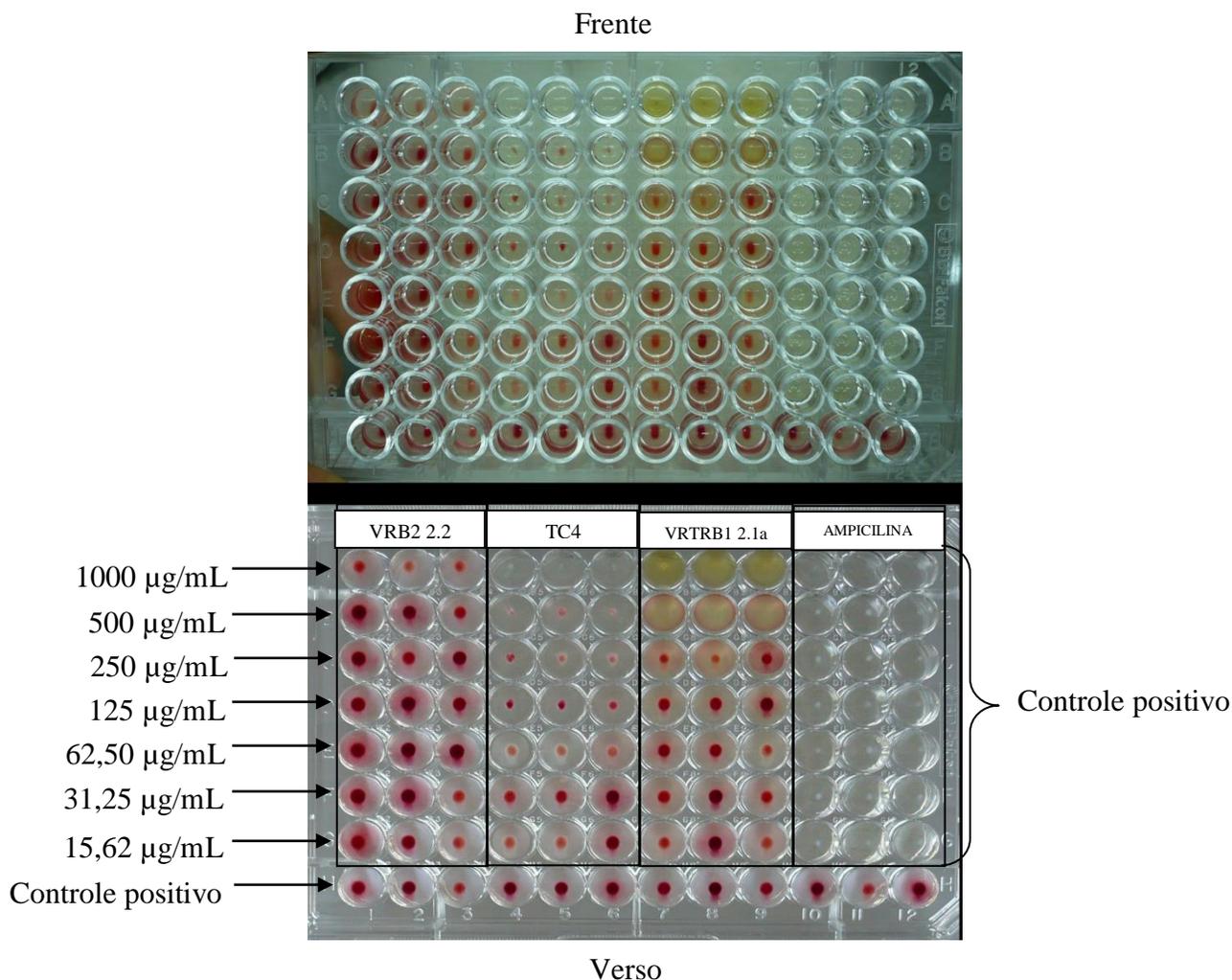


Figura 10 – Placa 2 de MID para *S. mutans*.

O extrato VRB2 2.2 não foi capaz de inibir totalmente o crescimento de *S. mutans* na concentração de 1000 µg/mL. As frações TC2 e TC3 foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans* na concentração de 1000 µg/mL, ocorreu atividade na concentração de 500 µg/mL, porém de menor intensidade. A fração TC4 inibiu o crescimento de *S. mutans* na concentração de 1000 µg/mL, foi observada atividade parcial até a concentração de 62,50 µg/mL. Para o extrato VRTRB1 2.1a foi observada atividade na concentração de 1000 µg/mL. A última fileira da microplaca serviu como controle positivo, sendo visualizado o crescimento bacteriano. Nas três últimas colunas foi utilizado antibiótico Ampicilina como controle negativo,

não ocorrendo crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações. Os resultados de MID em relação ao *S. mutans* podem ser vistos também na tabela 7.

Tabela 7

Dosagem inibitória mínima para *S. mutans*

| AMOSTRA TESTADA | Concentração do Extrato ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
|-----------------|--|-----|-----|-----|-------|-------|-------|
| | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,50 | 31,25 | 15,62 |
| VRB2 2.2 | R | R | R | R | R | R | R |
| VRTRB1 2.1 | S | S | R | R | R | R | R |
| TC2 (VRC2 2.2) | S | R | R | R | R | R | R |
| TC3 (VRC2 2.2) | S | R | R | R | R | R | R |
| TC4 (VRC2 2.2) | S | S | S | S | S | R | R |
| AMPICILINA | S | S | S | S | S | S | S |

R – Resistente; S – Sensível

Para determinação da dosagem inibitória mínima frente a *P. aeruginosa* foram testados 2 extratos brutos (VRC2 3.2 e VRTRB1 2.1a) e uma fração de VRC2 2.2 (TC4). Os resultados podem ser observados na figura 11.

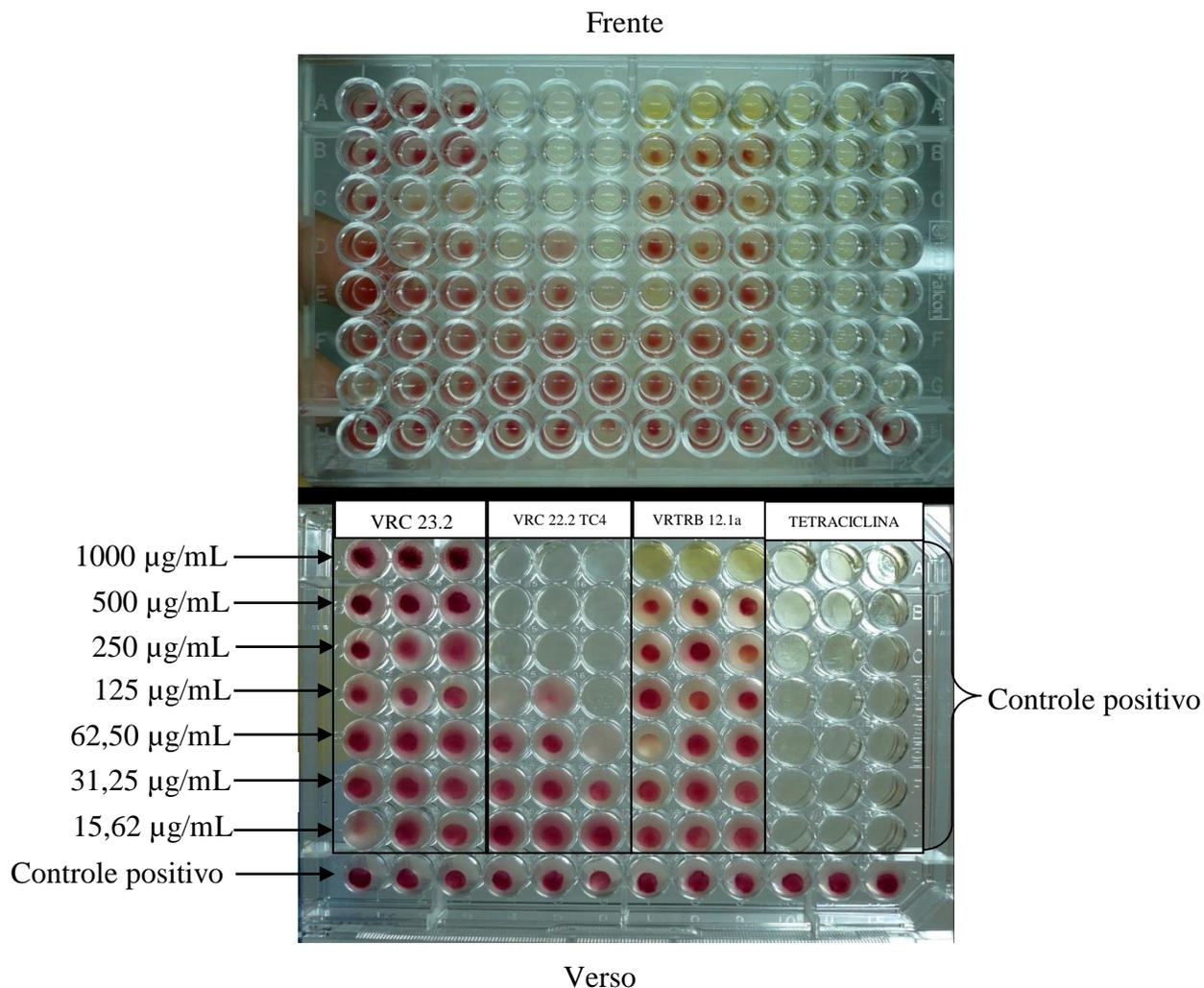


Figura 11 – Ensaio de MID para *P. aeruginosa*.

O extrato VRC2 3.2 não foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* na concentração de 1000 µg/mL. A fração de VRC2 2.2 (TC4) inibiu o crescimento nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL; sendo esta última a dosagem inibitória mínima. O extrato VRTRB1 2.1a apresentou resultado positivo na concentração de 1000 µg/mL.

As três últimas colunas foram reservadas para o controle positivo, tendo a Tetraciclina como antibiótico que impediu o crescimento bacteriano em todas as concentrações utilizadas. Os resultados relativos à dosagem inibitória para o *P. aeruginosa* foram organizados na tabela 8.

Tabela 8Dosagem inibitória mínima para *P. aeruginosa*

| AMOSTRA TESTADA | Concentração do Extrato ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
|-----------------|--|-----|-----|-----|-------|-------|-------|
| | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,50 | 31,25 | 15,62 |
| VRB2 2.2 | R | R | R | R | R | R | R |
| TC4 (VRC2 2.2) | S | S | S | R | R | R | R |
| VRTRB1 2.1a | S | R | R | R | R | R | R |
| TETRACICLINA | S | S | S | S | S | S | S |

R – Resistente; S – Sensível

5. DISCUSSÃO

A necessidade de novas medicações intracanal capazes de combater de maneira eficaz as bactérias e fungos resistentes ao preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares estimula a busca de avanços biotecnológicos. Os estudos na literatura comprovam que as soluções existentes apresentam ineficiência e desvantagem em relação a microrganismos mais resistentes como o *E. faecalis* e *C. albicans* (HANCOCK, 2001; LOVE, 2001; WALTIMO, et al. 2003; SIQUEIRA JR. et al. 2004; SAKAMOTO, et al. 2007).

Os produtos derivados de planta vêm sendo estudados cada vez de maneira mais intensa. Por mais que a finalidade dos estudos mude, em sua essência, todos buscam por meio do potencial antimicrobiano indicar uma direção para pesquisas futuras visando o desenvolvimento de novos produtos. Os trabalhos desenvolvidos com a *Arctium lapa* (PEREIRA, et al. 2005), *Pothomorfe umbellata* (SPONCHIADO, 2007), *Copaifera multijuga* (GARRIDO, et al. 2006; VASCONCELOS, et al. 2008), o própolis (KOO, et al. 2000; FERREIRA, et al. 2007) e o mel (BASUALDO, et al. 2007) demonstraram que se pode encontrar atividade antibacteriana e antifúngica contra cepas presentes na infecção endodôntica e cavidade bucal.

Devido à imensa variedade vegetal da Amazônia brasileira torna-se claro a necessidade da busca de alternativas que possam ser utilizadas na Odontologia. A pesquisa envolvendo determinada planta sempre é iniciada através de relatos de sua utilização em meio a população, despertando assim interesse científico em suas propriedades. Porém, analisando de forma crítica pode-se perceber que estudar especificamente uma planta mantém a pesquisa refém da disponibilidade do vegetal. Provando o benefício da sua

utilização, normalmente em forma de extrato, serão necessários cultivo e reprodução da matéria prima.

Dentro dessa realidade, os microrganismos endofíticos se apresentam como excelente alvo de pesquisas científicas. Os estudos desenvolvidos com bactérias e fungos endofíticos revelaram potencial antimicrobiano, antifúngico e antitumoral (LI, et al. 2008; GONG; GUO, 2009). O taxol, composto que apresenta atividade anticâncer e pode ser produzido por um fungo endofítico (*Taxomyces andreanae*) configura a maior contribuição desses microrganismos para a Medicina atual (STROBEL, 2003). O trabalho pioneiro desenvolvido por Souza et al. (2004) comprovou após pesquisa com 571 fungos endofíticos, isolados de plantas amazônicas, que alguns foram capazes de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *A. flavus* e *Bacillus* sp.

Soma-se ainda o fato de que, uma vez isolado, o microrganismo endofítico pode ser conservado e utilizado sempre que necessário para novas pesquisas, sem interferir na natureza das plantas. Sendo, portanto, um tema de interesse da área médica, farmacêutica e bioquímica; introduzir interesses da Odontologia nesse contexto pode ser uma nova orientação para estudos que envolvam a biodiversidade. Diante do exposto, esta pesquisa é pioneira na busca de metabólitos bioativos de fungos endofíticos para uso na odontologia.

O teste de difusão em ágar se apresenta como alternativa inicial para verificar dentre grande quantidade de amostras, qual delas possui potencial antimicrobiano. Diversos estudos, dentro e fora da Odontologia utilizam essa metodologia para pesquisa de substância, principalmente aquelas que têm natureza hidrófila (ESTRELA, et al. 2001; MENEZES, 2004; DOTTO, et al. 2006; LI, et al. 2008). A capacidade de difusão da substância no meio de cultura e a distância entre os poços podem influenciar no resultado do teste (VIANNA, et al. 2005), contudo tivemos cuidados especiais para padronizar e garantir a repetitividade dos resultados.

Em nosso estudo de 101 extratos 18% apresentaram atividade antimicrobiana. O resultado obtido pelo teste de difusão em ágar foi útil para direcionar o estudo. Por se tratar de um método simples, rápido e de baixo custo, mostra-se efetivo para realização de *screen*. O teste também serviu para excluir das fases seguintes a pesquisa mais aprofundada dos extratos de *Rollinia* sp. e *Duguetia. stelechantha*. O crescimento uniforme e total nas placas de petri de *E. faecalis* e *C. albicans* excluíram o teste com esses microrganismos nas outras fases da pesquisa.

Não foi observada diferença estatística, quando comparados entre si, dos extratos que apresentaram atividade frente a *S. aureus* (p-valor=0,986) e *P. aeruginosa* (p-valor=0,998). Mas o princípio ativo envolvido deve ser de moléculas diferentes pelo fato de *S. aureus* ser uma bactéria gram-positiva e *P. aeruginosa* ser gram-negativa. Vale ainda ressaltar a importância de *P. aeruginosa* em processos infecciosos que em pacientes imunossuprimidos, com câncer e debilitados leva a uma taxa elevada de óbitos. Em relação a inibição de *S. mutans*, o extrato VRTRB1 2.1a, teve destaque apresentando diferença estatística (p-valor=0,012) que sugere a busca da elucidação das moléculas bioativas.

Há uma escassez de estudos na literatura que confrontem extratos de fungos endofíticos da *V. amazonica* com as bactérias encontradas na cavidade bucal. Porém, existem estudos, com a metodologia de difusão em ágar, que comprovem a atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos de diversas plantas frente às bactérias testadas neste trabalho.

Castilho et al. (2002) relataram atividade de extratos de fungos endofíticos isolados de *Kennedia nigriscans*, planta medicinal utilizada por aborígenes na Austrália, frente a espécies de *E. faecalis* e *S. aureus*. Gong; Guo (2009) observaram atividade com extratos de fungos endofíticos isolados de *Dracaena cambodiana* e *Aquilaria sinensis*, plantas medicinais da China, frente a *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e *C. albicans*. Guimarães et al.

(2007) testaram extratos de fungos endofíticos isolados de *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, plantas encontradas no México, relatando atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *C. albicans*.

A autobiografia combina a CCD (cromatografia em camada delgada) com bioensaio *in situ*. Este é um método qualitativo aplicado para detecção de compostos antimicrobianos em misturas de composição complexa e mesmo até desconhecida (WEBER, 2005).

O resultado obtido na autobiografia não foi igual ao obtido pelo teste de difusão em ágar. Devido a metodologia, no extrato aplicado na placa CCD as substâncias presentes são separadas de acordo com a polaridade, sendo aceitável que ao se dividir alguns dos extratos não apresentem a mesma resposta antimicrobiana que o teste de difusão realizado anteriormente, pois a separação leva a perda de sinergismo entre o grupo de moléculas.

Dentre os dezoito extratos testados, somente dois apresentaram resultado positivo na autobiografia, sendo VRTRB1 2.1a frente a *S. mutans* e VRC2 3.2 frente a *P. aeruginosa*. Foram analisadas também as frações TC1, TC2, TC3 e TC4 de VRC2 2.2. As frações TC2, TC3 e TC4 apresentaram atividade frente a *S. mutans*. Os *spots* que estão na parte superior são substâncias menos polares e os que se localizam na base são mais polares. Todos eles apresentaram atividade na região da base da placa CCD, indicando que as substâncias ativas possuem alta polaridade e que é necessário um sistema de arraste mais polar para deslocá-las da base de aplicação. Estes resultados indicam que a substância bioativa é bastante polar e facilitará na ocasião de purificação e análise.

Para os dois extratos e três frações que apresentaram resultado positivo na autobiografia foi realizado ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). A fração TC4 foi a que apresentou atividade na menor concentração (250 µg/mL) frente a *P. aeruginosa*, enquanto para VRTRB1 2.1a a menor concentração foi de 1000

$\mu\text{g/mL}$ para o mesmo microrganismo. O resultado da fração TC4 é bom e pode melhorar se identificada a substância bioativa ou caso seja mais de uma mantendo a interação sinérgica das substâncias.

Em relação a *S. mutans* todas as frações testadas (TC2, TC3, TC4) foram capazes de inibir o crescimento na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$, mas TC4 reduziu o número de células viáveis em outras concentrações. É possível que durante o fracionamento do extrato a mesma substância esteja presente nas frações TC2, TC3 e TC4 porque apenas a primeira da sequência perdeu a atividade. Além do mais foi observado o mesmo resultado na autobiografia o que corrobora com essa observação. O extrato VRTRB1 2.1a foi efetivo na mesma concentração. O ensaio foi iniciado na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$, sendo esta menor que a utilizada no teste de difusão em ágar (2 mg/mL), dessa forma, quando não foi observada atividade na placa de elisa, pode-se concluir que a dosagem está entre 2 mg/mL e 1 mg/mL .

Os resultados encontrados em nosso estudo indicam que os extratos obtidos de fungos endofíticos de *V. amazonica* apresentaram potencial antimicrobiano melhor que os outros hospedeiros. O extrato VRTRB1 2.1a e a fração TC4 de VRC2 2.2 devem ser melhor estudados pois apresentaram bons resultados no teste de difusão em ágar, na autobiografia e no ensaio para determinação da MID respectivamente. Estudos complementares realizados pelo Grupo de Estudos de Microrganismos da Amazônia buscam a purificação das substâncias ativas contidas em extratos assim como moléculas responsáveis pelas atividades.

Os extratos de fungos endofíticos de plantas amazônicas devem ser mais explorados, pois embora os extratos testados não tenham demonstrado ação antimicrobiana frente às cepas de *E. faecalis* e *C. albicans*, houve detecção da atividade frente a *S. aureus*,

P. aeruginosa e *S. mutans*. É fato que o *S. mutans* está entre um dos principais responsáveis pelo aparecimento da doença cárie, por esse motivo é possível que este estudo possa contribuir com novas pesquisas envolvendo o combate ao biofilme dental para desenvolvimento de dentifrícios, pastas profiláticas ou colutórios.

6. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Dentre os 41 extratos testados de fungos endofíticos de *V. amazonica*, 44% foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. mutans*.
- O extrato VRTRB1 2.1a apresentou maior atividade frente a *S. mutans*.
- A fração TC4 apresentou a menor dosagem inibitória mínima (MID) frente a *P. aeruginosa* e diminuiu a proliferação celular de *S. mutans*.
- Os extratos e frações de extratos que apresentaram atividade antimicrobiana possuem ativos de polaridade elevada.
- O extrato VRTRB1 2.1a e a fração TC4 devem ser melhor estudados para purificação de substâncias, isolamento e elucidação das moléculas.
- Os extratos de fungos endofíticos originados de *Rollinia* sp. e *Duguetia* sp. não apresentam atividade antimicrobiana frente as cepas testadas.
- Nenhum dos extratos avaliados foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M. et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 1, p. 30-36, 2005.

ABNADER, CD. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente à *Candida alicans* e ao *Enterococcus faecalis*.** Manaus: UFAM, 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, 2005.

ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 1, p. 39-47, 1998.

ADIB, V. et al. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 8, p. 542-51, 2004.

AMARO-BIANCO, E. et al. Screening of endophytic bacteria from *Victoria amazonica* that produce polyhydroxyalkanoate (PHA). In: XXXVII Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, São Paulo, 2009.

AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. **Journal of Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 104-16, 2008.

AZEVEDO et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 1-36, 2000.

BANDEIRA, M. F. C. L. 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. **Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia**, v. 3, n. 16, p. 42-9, 1999.

BARBOSA, C. A. M. et al. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 5, p. 297-300, 1997.

BASUALDO, C. et al. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary microbiology**, v. 124, p. 375-81.

BAUMGARTNER, J. C. et al. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p. 695-98, 2000.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

- BAYSAL, O. et al. An inhibitory effect of a new bacillus subtilis strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 30, p. 1-8, 2009.
- BERGMANS, L. et al. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 7, p. 547-57, 2006.
- BERNABÉ, P. F. E. et al. Avaliação “in vitro” da influência da aplicação de quelantes na microinfiltração de obturações retrógradas com cimento sealapex. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.27, n.2, p. 107-12, 2006.
- CARNEIRO, S. M. B. S. et al. Uso do metronidazol como medicação intracanal em dentes com necrose pulpar e reação periapical. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 47, p. 78-82, 2005.
- CASTILHO, U. F. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, n. 2675-85, 2002.
- CASTILHO, U. F. et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **Microbiology**, v. 224, p. 183-190, 2003.
- CHEUNG, G. S. P.; HO, M. W. M. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, n. 6, p. 332-337, 2001.
- CHU, F. et al. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 1, p. 17-32, 2006.
- COSTA, M. S. T. População endofítica de fungos filamentosos, bactérias e actinomicetos de *Duguetia stelechantha*, uma Annonaceae da floresta amazônica. In: Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Bahia. **Anais**. p. 32.
- CUNICO, M. M. et al. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97-103, 2004.
- CUTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual Reviews Microbiology**, v. 45, p. 187-218, 1991.
- DAISY, B. H. et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 148, p. 3737-41, 2002.
- DISTEL, J. W. et al. Biofilm formation in medicated root canals. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 10, p. 689-93, 2002.
- DAHLÈN, G. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 309-12, 2000.
- DOTTO, S. R. et al. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 53, p. 266-9, 2006.

DRUMOND, M. R. S. et al. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 4, n. 1, p. 33-8, 2004.

ELDENIZ, A. U. et al. Bactericidal efficacy of Er,Cr:YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an ex vivo pilot study. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 2, p. 112-9, 2007.

ERCAN, E. et al. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, n. 2, p. e27-e31, 2006.

ERZA, D. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p. 785-93, 2004.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **International Journal of Endodontic**, v. 40, n. 2, p. 85-93, 2007.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 6, p. 416-8, 1999.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, n. 3, p. 181-5, 2004.

ESTRELA, C. et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 5, p. 341-5, 2001a.

ESTRELA, C. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 1, p. 15-17, 1998.

ESTRELA, C. et al. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 12, p. 720-3, 2001b.

ESTRELA, C. **Metodologia Científica**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. **Journal of Applied Oral Science**, v. 11, n. 4, p. 269-82, 2003.

FACHIN, E. V. F. et al. Alternativas de medicação intracanal em casos de necrose pulpar com lesão periapical. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 54, p. 351-7, 2006.

FERGUSON, J. W. et al. Effectiveness of Intracanal Irrigants and Medications against the yeast *Candida albicans*. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 2, p. 68-71, 2002.

FERREIRA, C. M. **Avaliação "in vitro" da atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas em endodontia sobre bactérias anaeróbias**. São Paulo: USP, 1999. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 1999.

FERREIRA, F. B. A. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 104, n. 5, p. 709-16, 2007.

FIRAKOVA, S. et al. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, n. 3, p. 251-7, 2007.

FOUAD, A. F. et al. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp. and *Streptococcus* spp. in endodontic infections. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 4, p. 249-55, 2003.

FREDERICH, M. et al. New antimalarial and cytotoxic sungenine derivatives from *Strychnos icaja* roots. **Planta Med**, v. 66, p. 262-9, 2000.

GAMA, A. M. et al. Anticancer and antifungal activities of extracts of an endophytic fungus from the Brazilian Amazonian plant *Rollinia* sp. **In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, São Paulo, 2009.**

GARRIDO, ADB et al. Estudo de um novo cimento endodôntico à base de óleo-resina de copaíba. **Brazilian Oral Research**, v. 20, p. 276, 2006.

GOMES, B. P. F. A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n. 3, p. 155-61, 2002.

GOMES, B. P. F. A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 6, p. 424-8, 2001.

GONG, L.J.; GUO, S.X. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 731-6, 2009.

GUIMARÃES, D.O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, 2007.

GURGEL-FILHO, E. D. et al. *In vitro* evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatment. **Brazilian Oral Research**, v. 21, n. 4, p. 308-13, 2007.

HAAPASALO, M. et al. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 29-56, 2003.

HANCOCK, H. H. et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 91, n.5, p. 579-86, 2001.

HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 2, p. 75-85. 2003.

- HEMS, R. S. et al. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 1, p. 22-29, 2005.
- HOOD, J. R. et al. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 428-33, 2003.
- HUANG, Y. et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-7, 2001.
- KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch. Oral Biol**, 2000, v. 45, p. 141-8.
- KOPPER, P. M. P. et al. Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana de três cimentos endodônticos. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n56, p. 106-11, 2007.
- ISHIZAKI, N. T. et al. Thermographical and morphological studies of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root canal walls. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 4, p. 291-7, 2004.
- LEONARDO, M. R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- LI, J. Y. et al. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56, p. 463-8, 2001.
- LI, J. Y. et al. The induction of taxol production in the endophytic fungus, *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 259-64, 1998.
- LIMA, A. M. **Estudo da atividade de fungos endofíticos e extratos de *Piper aduncun* L. (Piperaceae) sobre o *Mycobacterium tuberculosis***. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.
- LOPES, H. P.; SIQUEIRA-JR, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2004.
- LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. **International Journal of Endodontics**, v. 34, p. 399-405, 2001.
- LUI, J. N. et al. In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Endodontics**, v. 37, n. 2, p. 105-13, 2004.
- MENEZES, M. M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **International Endodontic Journal**, v. 37, n.5, p. 311-19, 2004.

MELO, L. S. et al. First report of *Trichoderma piluliferum* and *T. asperellum* isolates from *Victoria amazonica* identified by molecular techniques. **In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, São Paulo, 2009.**

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

MORI, G. G. **Estudo microscópico e morfométrico do efeito de substâncias anti-reabsortivas usadas como medicação intracanal em dentes de ratos avulsionados e reimplantados tardiamente.** São Paulo: USP, 2005. Tese (Doutorado em Odontologia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2005.

MURRAY, P. E. et al. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 1, p. 66-70, 2008.

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 11, p. 778-81, 2004.

NAIR, P. N. R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 4, p. 249-281, 2006.

NAIR, P. N. R. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 99, n. 2, p. 231-52, 2005.

NEGM, M. M. et al. Intracanal use of a corticosteroid-antibiotic compound for the management of posttreatment endodontic pain. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 92, n. 4, p. 435-9, 2001.

NOIRI, Y. et al. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 10, p. 679-83, 2002.

OLIVEIRA, A. C. L. Antibiosis for detection of endophytic bacteria isolated from medicinal plant of the Amazon. **In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, São Paulo, 2009.**

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-76, 2007.

PALLOTA, R. C. et al. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. **Australian Endodontic Journal**, v. 33, n. 3, p. 107-11, 2007.

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

PEREIRA, J. V. et al. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, n. 3, p. 192-196, 2005a.

- PEREIRA, J. V. et al. Estudos com extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 49, p. 262-9, 2005b.
- PETER, L. B. et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 2, p. 76-81, 2001.
- PHILLIPE, G. et al. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 405-16. 204.
- PINHEIRO, E. T. et al. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 1, p. 137-44, 2006.
- POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas Aquáticas do Pantanal**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2000.
- PORTENIER, I. et al. *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 135-59, 2003.
- SAKAMOTO, M. et al. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n.1, p. 19-23, 2007.
- SALEH, I. M. et al. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 3, p. 193-8, 2004.
- SASAKI, C. M. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme (ASTERACEAE)**. Curitiba: UFPR, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2008.
- SEAL, G. J. et al. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 268-74, 2002.
- SEDGLEY, C. M. et al. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 38, v. 10, p. 735-42, 2005.
- SEN, B.H. et al. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endodontics Dent. Traumatology**, v. 11, p. 6-9, 1995.
- SILVA, F. B. et al. Natural medicaments in endodontics: a comparative study of anti-inflammatory action. **Brazil Oral Research**, v. 18, n. 2, p. 174-9, 2004.
- SILVA, M. A. et al. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 256-67, 2005.
- SIQUEIRA-JR, J. F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2001.

SIQUEIRA-JR, J. F. et al. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 6, p. 308-10, 1996.

SIQUEIRA-JR, J. F. et al. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **Journal of Endodontics**, v 29, n. 8, aug. 2003.

SIQUEIRA-JR, J. F. et al. Periapical actinomycosis and infection with *Propionibacterium propionicum*. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 78-95, 2003.

SIQUEIRA-JR, J. F.; LOPES, H. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 3, p. 216-220, 2001.

SIQUEIRA-JR, J. F.; LOPES, H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Journal of Endodontic**, v. 32, p. 361-9, 1999.

SIQUEIRA-JR, J. F.; UZEDA, M. et al. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 10, p. 663-5, 1998.

SIQUEIRA-JR, J. F.; UZEDA, M. et al. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 3, p. 167-9, 1997.

SIQUEIRA-JR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 97, n. 5, p. 632-41, 2004.

SIRÉN, E. K. et al. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. **European Journal of Oral Sciences**, v. 112, n. 4, p. 326-31, 2004.

SJÖGREN, U. et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, n. 5, p. 297-306, 1997.

SOARES, I. J.; GOLDBERG, F. **Endodontia: técnicas e fundamentos**. São Paulo: Artmed, 2001.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-95, 2004.

SOUZA, A. Q. L. et al. Antibiose de extratos de fungos endofíticos de *Victoria amazonica* contra a bactéria fitopatogena *Ralstonia solanacearum*. In: Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Bahia. **Anais**. p. 29.

SOUZA, H. C. A. Investigação fitoquímica e isolamento da substância antibacteriana presente na espécie *Ananas erectifolius* (curauá). **Revista Científica da UFPA**, v 4, abr 2004.

SPONCHIADO-JR, E. C. **Atividade antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata*.** Manaus: UFAM, 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2006.

STABHOLZ, A. et al. Lasers in endodontics. **Dental Clinics of North America**, v. 48, n. 4, p. 809-32, 2004.

STEINBERG, D. In vitro antibacterial effect of RC-Prep components on *Streptococcus sobrinus*. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 15, n. 4, 171-174, 1999.

STROBEL, G. A. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, v. 145, p. 1919-26, 1999.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-44, 2003.

STROBEL, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. H. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. **Chemistry & Biology**, v. 4, n. 7, p. 529-36, 1997.

SUNDE, P. T. et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 4, p. 304-10, 2002.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

SUNDQVIST, G. et al. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 78, n. 4, p. 522-30, 1994.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Life as an endodontic pathogen. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 3-28, 2003.

TANDJUNG, L. et al. Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 11, p. 845-51, 2007.

TROSNTAD, L.; SUNDE, P. T. The evolving new understanding of endodontic infections. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 57-77, 2003.

TURK, B. T. et al. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 106, n. 3, p. 457-62, 2008.

VALERA, M. C. et al. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 6, p. 401-03, 2001.

VASCONCELOS, K. R. V. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de Copaifera multijuga Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (Supl.), dez. 2008.

VIANNA, M. E. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 97, n. 1, p. 79-84, 2004.

VIANNA, M. E. et al. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, n. 3, p. 175-80, 2005.

VIVACQUA-GOMES, N. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 10, p. 697-704, 2005.

WALTIMO, T. M. T. et al. Examination on *Candida* spp. In refractory periapical granulomas. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 643-7, 2003.

WALTIMO, T. M. T. et al. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, 96-101, 1997.

WALTIMO, T. M. T. et al. *In vitro* yeast infection of human dentin. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 4, p. 207-9, 2000.

WALTIMO, T. M. T. et al. Yeasts in apical periodontitis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348-81, 2004.

WEBER, A. D. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium***. Santa Maria : UFSM, 2005. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

WEYNE, S. et al. Avaliação clínica de dois enxaguatórios bucais. **Odontis**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 8, p. 3-4, 2003.

WU, M. K. et al. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 5, p. 343-56, 2006.

ZHANG, H. W. et al. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-71, 2006.