

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E  
PATOLOGIA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
FOLHAS DA *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**

**CURITIBA  
2007**

**LUIS FILIPE BOROS**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
FOLHAS DA *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**

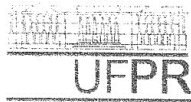
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Aparecida Vicente.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma Faria Zawadzki Baggio

**CURITIBA**

**2007**



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE**  
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

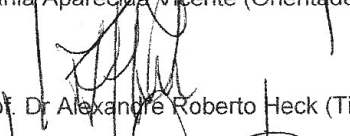
### “AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DA *SCHINUS* *TEREBENTHIFOLIUS RADDI* (AROEIRA)”

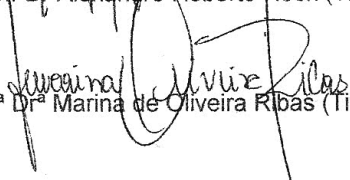
por

**LUIS FILIPE BÓROS**

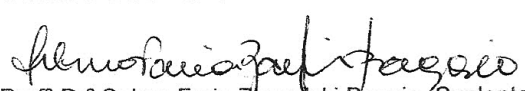
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vânia Aparecida Vicente (Orientador e Presidente-UFPR)

  
Prof. Dr. Alexandre Roberto Heck (Titular-UFPR)

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marina de Oliveira Ribas (Titular-PUCPR)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia (Suplente-UFPR)

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Selma Faria Zawadzki Baggio (Suplente-UFPR)

Curitiba, 23 de abril de 2007

Boros, Luis Filipe

Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da *schinus terebenthifolius* raddi (aroeira). / Luis Filipe Boros. – Curitiba, 2007.

84 f.: il., color. ; 30cm.

Orientador: Vânia Aparecida Vicente

Co-orientador: Selma Faria Zawadzki Baggio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Básica.

1. Odontologia - medicação 2. Fitoterapia 3. Canal I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Baggio, Selma Faria Zawadzki IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Básica

CDD (20. ed.) 617.67

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, pela força, pela iluminação e especialmente...

A inspiração, conselhos e amor de meus pais Luiz Fernando e Edna e minha noiva Priscilla que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora e amiga Professora Doutora Vânia Aparecida Vicente, pelos ensinamentos e ajudas nesta fase de minha vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro, Coordenadora, pela dedicação ao programa de pós-graduação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Faria Zawadzki Baggio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela co-orientação e auxílio na obtenção dos extratos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Helena L. N. Sales Maia do Departamento de Química e sua equipe de laboratório pelos extratos obtidos e auxílio nas questões químicas do trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina de Oliveira Ribas pelo auxílio de idealização do trabalho.

Ao Professor e amigo Dr. Alexandre Roberto Heck pelo incentivo, incentivo e auxílio para a participação do curso e trabalho.

Aos Professores e amigos Egas Munis de Aragão e Sérgio Herrero de Moraes pelo incentivo e direcionamento de minha carreira.

À Prof<sup>a</sup> Maria Helena Sousa pelo auxílio na coleta das amostras de polpas no P.A. Odontológico PUC-PR

À equipe de funcionários dos Pronto Atendimento Odontológico UFPR e PUC-PR.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Hiroko Higuti pelo auxílio na identificação dos isolados e fornecimento das amostras ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

À Colega de curso e Mestre Josiane Aparecida Gomes Figueiredo pelo fornecimento da amostra ATCC de *Escherichia coli*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	4
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1 INFECÇÃO ENDODÔNTICA .....	5
3.2 MICROFLORA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES.....	7
3.3 FORMAS DE TRATAMENTOS.....	12
<b>3.3.1 Tratamentos Alternativos</b> .....	15
3.4 <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (AROEIRA) .....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 LINHAGENS REFERÊNCIA .....	23
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS A PARTIR DE POLPAS DENTAIS NECROSADAS .....	23
4.3 COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS DA <i>S. terenbenthifolius</i> Raddi.....	25
<b>4.3.1 Extração com Éter de Petróleo e Metanol</b> .....	25
<b>4.3.2 Fracionamento em Coluna a Vácuo</b> .....	27
4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> FRENTE AO EXTRATO DE AROEIRA.....	27
<b>4.4.1 Preparação do Inóculo</b> .....	27

<b>4.4.2 Efeito Antimicrobiano do Extrato Bruto e Fracionado.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.2.1 Efeito antimicrobiano do extrato bruto e fracionado em meio sólido .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.2.2 Efeito antimicrobiano do extrato bruto e fracionado em meio líquido .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.2.3 Avaliação em meio líquido do efeito antimicrobiano da associação das diferentes frações do extrato bruto .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.3 Avaliação da ação antimicrobiana do extrato utilizando um modelo <i>in vitro</i> de infecção endodôntica .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.3.1 Modelo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.3.2 Avaliação da ação antimicrobiana de <i>S. terebenthifolius</i> Raddi.....</b>	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 ISOLAMENTO.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE “<i>IN VITRO</i>” FRENTE AO EXTRATO DE AROEIRA.....</b>	<b>37</b>
<b>5.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO UTILIZANDO UM MODELO “<i>IN VITRO</i>” DE INFECÇÃO ENDODÔNTICA.....</b>	<b>43</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 1 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (80%) BRUTOS E FRACIONADOS OBTIDOS DE FOLHAS EXTRAÍDAS DE PLANTAS COLETADAS NA REGIÃO DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, NO ANO DE 2002.....</b>	<b>57</b>

TABELA 1 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	57
TABELA 2 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	57
TABELA 3 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	58
TABELA 4 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	58
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	59
TABELA 6 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	59
<b>ANEXO 2 -</b>	<b>AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (80%) FRACIONADOS OBTIDO A PARTIR DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS PROVENIENTES DE PLANTAS COLETAS NA REGIÃO DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, NO ANO 2005.....</b>	<b>60</b>



TABELA 1 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005.....	60
TABELA 2 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005 .....	60
TABELA 3 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005 .....	61
TABELA 4 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005 .....	61
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002 .....	62
TABELA 6 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002 .....	62
<b>ANEXO 3 -</b>	<b>AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (30%) BRUTOS E FRACIONADOS DE FOLHAS PROVENIENTES DE PLANTAS COLETAS NA REGIÃO DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, NOS ANOS 2002 E 2005.....</b>	<b>63</b>

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	63
TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	63
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	64
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	64
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	65
TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002 .....	65
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005.....	66

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005 .....	66
TABELA 9 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005 .....	67
TABELA 10 -AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005.....	67
TABELA 11 -AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002.....	68
TABELA 12 -AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM $\mu\text{g/mL}$ DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002 .....	68
<b>APÊNDICE</b> .....	69
<b>APÊNDICE I - Meios de Culturas e Soluções</b> .....	70

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDODÔNTICAS A PARTIR DE POLPAS NECROSADAS.....	24
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi .....	26
FIGURA 3 - VISTA DA MONTAGEM DO MODELO EXPERIMENTAL ADAPTADO PARA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE <i>S. terebenthifolius</i> Raddi.....	30
FIGURA 4 - VARIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO SUBSTRATO PARA CADA CULTURA DENTRO DO MODELO EXPERIMENTAL TESTADO .....	32
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, (ANO DE COLETA, 2002) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO: MEIO SÓLIDO (I) E MEIO LÍQUIDO (II).....	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPÉCIES FREQUENTEMENTE ISOLADAS DE INFECÇÕES PULPARES (JORGE, 1995).....	9
TABELA 2 - RENDIMENTO DE EXTRATOS OBTIDOS.....	35
TABELA 3 - FRACIONAMENTO REALIZADO A PARTIR DO EXTRATO SECO OBTIDO NO ANO DE 2005.....	36
TABELA 4 - FRACIONAMENTO REALIZADO A PARTIR DO EXTRATO SECO DE FOLHAS OBTIDO NO ANO DE 2002 .....	36
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO SÓLIDO (BHI-S) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDAS DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002 .....	37
TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi PARA DIFERENTES CULTURAS EM MEIO LÍQUIDO (BHI-S). ANO DE COLETA 2002 .....	37
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO DAS FRAÇÕES (ACETATO E METANOL) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002 .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$	– micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	- microlitro
ATCC	- American Type Culture Collection
cm	– centímetro
DNA	– ácido desoxirribonucléico
g	- grama
mg	- miligrama
mL	– mililitro
mm	– milímetro
Nd:YAG	– Neodímio - Ytrio Alumínio Granada
nm	- nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	– graus Celsius
$\text{O}_2$	– gás oxigênio
P. A.	– pró-análise
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i>
ppm	– partes por milhão
UFC	– unidade formadora de colônia
UFC/mL	- unidade formadora de colônia por mililitro
UV	– ultravioleta
W	– Watt

## RESUMO

A polpa dental com a injúria torna-se inflamada e os microrganismos colonizadores da boca se fixam no tecido doente e iniciam a infecção endodôntica. Com o passar do tempo esta se agrava com as transições de espécies bacterianas e da ampliação das estruturas invadidas sem que haja o tratamento. As medicações sofrem limitações na presença de coleção purulenta, restos de tecido necrótico, necessidade de preparo químico-mecânico do canal, não neutralização dos produtos tóxicos e danos ao tecido do hospedeiro (paciente) e sendo assim outras formas de tratamento têm sido investigados, como os fitoterápicos. Dentre as medicações fitoterápicas conhecidas está o extrato hidroalcoólico de cascas e folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), muito utilizada em doenças infecciosas de pele, trato gastrointestinal e região pélvica urinária. Com a parceria do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná e Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, foram obtidos extratos totais brutos e fracionados das folhas de plantas coletadas no ano de 2002 e 2005 no Litoral do Estado do Paraná. Sendo assim seu potencial antimicrobiano foi avaliado frente a isolados de polpa necrosada e linhagens referência de *Staphylococcus aureus* ATCC 27213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35219 determinando a concentração inibitória mínima em meio líquido e meio sólido. A partir dos resultados verificou-se uma concentração inibitória mínima maior em meio líquido (850 µg/mL) do que em meio sólido (650 µg/mL) para os extratos brutos. Com o fracionamento dos extratos não foram observadas inibições das bactérias utilizando as frações isoladamente. Da ação antimicrobiana do extrato, um modelo de infiltração marginal foi proposto para avaliar o potencial do substrato como medicação endodôntica, os resultados mostraram eficiência na inibição e controle bacteriano.

Palavras-chave: *Schinus terebenthifolius* Raddi. Fitoterapia. Medicação intracanal. Extrato hidroalcoólico.

## ABSTRACT

The dental pulp with the injury becomes inflamed and the colonizes microorganisms of the mouth fix in the sick tissue and they initiate the endodontic infection, with the time this aggravates with the transitions of bacterial species and the magnifying of the invaded structures without that it has the handling. The medications have limitations on the presence of pus collection, necrotic tissue remaining portions, necessity of housekeeping chemistry-mechanic of the endodontic conduit, neutralization of the toxic products and damages to the tissue of the host (patient), however other forms of handling have been investigated as the phytotherapy. Amongst known phytotherapy medications it is the hydroalcoholic extract of rinds and leaves of *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), much used in infectious illnesses of skin,, gastrointestinal tract treatment and urinary pelvic region. With the partnership of the Department of Biochemist and Molecular Biology, of the Department of Chemistry of the Federal University of the Paraná and Department of Dentistry of the Pontifical University Catholic of the Paraná, raw and fractioned total extracts of leaves of plants collected in the year of 2002 and 2005 in the Coast of the State of the Paraná had been gotten. Being thus its potential antimicrobials front isolated of necrotic pulp and the reference strains was evaluated of *Staphylococcus aureus* ATCC 27213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 35219 determining the minimum inhibitory concentration in liquid culture media and solid way. From the results minimum greater in half liquid was verified a inhibitory concentration (850 µg/mL) of that in half solid (650 µg/mL) for raw extracts. With the division into fractions of extracts the fractions had not been observed inhibitions of the bacteria using separately. Of the antimicrobial action of the extract, an marginal infiltration model was considered to evaluate the potential of the substratum as endodontic medication, the results had shown to efficiency in the inhibition and bacterial control.

Key-words: *Schinus terebenthifolius* Raddi. Phytotherapy. Endodontic medication. Hydroalcoholic extract.



## INTRODUÇÃO

São variadas as causas de dor associada à infecção pulpar como a pulpite reversível ou irreversível, necrose pulpar sem envolvimento periapical ou com envolvimento periapical, como abscesso, cisto e granuloma. Para que um tecido pulpar se apresente nos estados patológicos citados devem existir agressões nos mais variados graus à estrutura rígida do dente, como trauma seguido de fratura ou doença cárie que destroem o esmalte e dentina promovendo alteração e ou exposição do tecido pulpar à infecção (LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN; BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA *et al.*, 1994; ESTRELA, 2004).

Assim, existem duas linhas de tratamento, quando o tecido inflamado produz desconforto e dor ao paciente sendo esse extirpado, pois nesta fase ainda não se tem contaminação por microrganismos em toda a extensão do canal radicular. Sendo assim o tratamento terá o propósito de remover através de técnicas endodônticas, o tecido inflamado de maneira a restabelecer o estado de saúde do órgão dental e assim conforto na ausência da dor (LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN e BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA *et al.*, 1994; ESTRELA, 2004).

Nas pulpites uma medicação combinada de antiinflamatório esteróide com antibiótico tópico é utilizada para que o tecido remanescente desinflame e não infeccione. Nas necroses, as bactérias que colonizam a polpa em decomposição são combatidas freqüentemente utilizando o paramonoclorofenol com furacim, o tricresolformalina, formocresol e o hidróxido de cálcio (LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN e BURNS 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA *et al.*, 1994; ESTRELA, 2004).

Como medicações intracanaís também se utiliza o paramonoclorofenol (PMCF) e o tricresolformalina que são de rápida aplicação e não necessitam do preparo químico-mecânico no canal, mas sim de um saneamento do conduto para remover todo o material necrótico. O PMCF tem sua ação anti-séptica pelo fenol e liberação lenta de íons cloro da posição para do anel fenólico, atua por contato

e distância (vapores). Normalmente está associado a substâncias que ampliem seu espectro de ação e diminuam sua citotoxicidade. Não é capaz de neutralizar produtos tóxicos bem como possui um odor e sabor desagradável. Já o tricresolformalina está em forma de suspensão aquosa composta por três isômeros de metilfenol que é adicionado ao formaldeído para diminuir os efeitos irritantes. Sua ação é por contato ou distância (vapores). Como medicação de demora está restrito, pois a formalina se difunde pelos tecidos moles fixando-os ocasionando uma agudização além de formar trombos quando penetra na corrente sanguínea isquemiando o tecido e de apresentar ação antigênica (LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN e BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA et al., 1994; ESTRELA, 2004; BERGER, 2002).

O hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) é o medicamento intracanal de primeira escolha nos tratamentos endodônticos, pois apresenta uma ação antimicrobiana e mineralizadora (induz o reparo do tecido ósseo afetado pela infecção). Sua ação está ligada ao contato direto com as regiões contaminadas e lesões necessitando da realização do preparo químico-mecânico com soluções irrigadoras para remoção dos restos de tecidos necróticos e alargamento do diâmetro do canal radicular, que permitirá a aplicação da pasta de hidróxido de cálcio no interior do canal radicular (LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN e BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA et al., 1994; ESTRELA, 2004; BERGER, 2002).

Devido às limitações destes medicamentos, os fitoterápicos com ação antimicrobiana, vêm sendo recomendados como uma das alternativas de tratamento e, portanto, seus extratos têm sido objetos de investigação (MELO et al., 2002). E uma das principais justificativas de utilização tem sido o seu potencial de controle em relação a gêneros de bactérias, etiologicamente associadas às infecções do sistema de canais radiculares, e o fato de não causar danos aos tecidos do periodonto.

Desde os primórdios da civilização já era conhecido o efeito terapêutico de algumas plantas, antes mesmo de se conhecer as causas das doenças. Após um período onde utilizavam apenas os medicamentos industrializados, alguns

países estão resgatando o uso de plantas nativas como partes do tratamento de doenças (CARLSON, DOUGLAS e ROBERTSON, 1947; ANESINI e PEREZ, 1993; MARTINEZ et al., 1996; GUERRA et al., 2000; MELO et al., 2002; AMORIM e SANTOS, 2003; LIMA et al., 2004; RÍOS et al., 2005; TSHIKALANGE, MEYER e HUSSEIN, 2005). Com os resultados clínicos positivos no uso da fitoterapia, existe uma concentração de esforços de pesquisa, no sentido de determinar os compostos ativos, visando à uma futura produção industrial. Porém, a complexidade química é um obstáculo limitante nessa busca (MACIEL, PINTO e VEIGA, 2002).

Dentre as plantas de ação antimicrobiana encontra-se a aroeira (*Schinus terenthifolius* Raddi.), seu extrato hidroalcoólico é popularmente no controle de infecções (FLEIG, 1989; LISBOA NETO et al., 1998), inclusive como bochechos pós exodontias (LANZONI, 2006; RIBAS et al, 2006). Os resultados mostram eficiência na ação antimicrobiana e no reparo tecidual (MARTINEZ, GONZÁLEZ e BADELL, 1996; GUERRA et al., 2000; AMORIM et al., 2003; LIMA et al., 2004)

A aroeira vem sendo intensivamente investigada principalmente os efeitos terapêuticos das frações dos extratos brutos de folhas e caules, visando conhecer os princípios ativos responsáveis pela ação antimicrobiana e antiinflamatória (JORGE e MARKMANN, 1996; MELO JUNIOR et al., 2000; LANZONI, 2006).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo investigar a ação antimicrobiana dos componentes ativos do extrato hidroalcoólico de folhas de *S. terenthifolius* Raddi e demonstrar o potencial da aplicação deste substrato para o desenvolvimento de uma nova medicação alternativa no controle de infecção endodôntica.

## 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter e Fracionar o extrato hidroalcoólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira).

Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) da ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de folhas de *S. terebinthifolius* Raddi (aroeira).

Comparar a ação antimicrobiana do extrato bruto com os componentes fracionados do extrato hidroalcoólico de folhas *S. terebinthifolius* Raddi (aroeira) frente a linhagens referencias de bactérias resistentes a drogas.

Propor a adaptação de um modelo de infecção “*in vitro*”, visando testar o potencial antimicrobiano dos princípios ativos do extrato hidroalcoólico (bruto e fracionado) de folhas de *S. terebinthifolius* Raddi.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 INFECÇÃO ENDODÔNTICA

Fatores que causam a injúria à polpa induzem a mesma a defender-se alterando seu estado normal para inflamado. Nessa situação, os microrganismos colonizadores normais da boca são capazes de invadirem esse tecido, fixando-se e multiplicando e conseqüentemente, agredindo o tecido, caracterizando assim a infecção endodôntica (JORGE, 1995; LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN e BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA et al., 1994; ESTRELA, 2004; De UZEDA et al., 2002).

São diversas as via de infecção pulpar, as bactérias invadem a polpa através da exposição dos canais acessórios e/ou forame apical na doença periodontal, exposição dentinária por cárie, erosão ou fratura de esmalte, procedimentos restauradores, anacorese e exposição pulpar direta. Também um selamento oclusal rompido ou restauração inadequada expondo os túbulos dentinários (ALBUQUERQUE et al., 1999). A infecção endodôntica sempre está ligada a qualquer bactéria que esteja presente no interior do sistema de canais radiculares, pois em situações de higidez pulpar, essa não é infectada por constituir a polpa uma barreira físico-imunológica contra as bactérias presentes naquele sistema (SIQUEIRA, 2002).

Quando a polpa é exposta à saliva contaminada com a microbiota bucal, ocorrem alterações patológicas na polpa e tecidos periapicais. As culturas bacterianas são originárias de material de polpa exposta ou necrosada. Dentre os mecanismos microbianos de agressão existem os de efeitos diretos (competitivo, mecânico, químico e produção de toxinas e enzimas) e os de efeitos indiretos mediados pelo hospedeiro (resposta inflamatória, liberação de enzimas, fenômenos decorrentes da fixação do complemento e fenômenos imunológicos humoral e celular) (FARBER e SELTZER, 1988; DE DEUS, 1992; ESTRELA et al., 1994; JORGE, 1995; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; COHEN e BURNS, 2000; ESTRELA, 2004; LOPES e SIQUEIRA, 2004).

Da mesma forma que na infecção pulpar, a presença de microrganismos

é essencial na progressão e manutenção das patogêneses perirradiculares ou periapicais. Esses microrganismos encontram-se protegidos do sistema imune do hospedeiro no interior dos canais radiculares. Quando localizadas no ápice do sistema de canais radiculares estas bactérias são mantidas isoladas do periápice inflamado pela densa população de neutrófilos polimorfonucleares e uma camada de epitélio odontogênico no forame apical, gerando um equilíbrio e conseqüentemente levando a uma inflamação crônica periapical. Porém algumas espécies bacterianas são capazes de contornar essa defesa e instalar-se nos tecidos dentários adjacentes (FARBER e SELTZER, 1988; SIQUEIRA, 2002).

Com a progressão da infecção, microrganismos, seus produtos e co-produtos que inicialmente estão apenas no canal principal, invadem os demais canais do sistema. Isso leva à lesão periapical e também pode causar infecção extrarradicular com reabsorção óssea. Na lesão periapical a superfície radicular apresenta áreas de cemento e dentina reabsorvidas que são colonizadas por microrganismos (LEONARDO et al., 2002).

LEONARDO et al., 2002 estudando a superfície externa de dentes através de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram a presença de microrganismos em lesões periapicais. Neste estudo foram utilizados 21 dentes divididos em três grupos de acordo com sua condição pulpar e periapical, (polpas com vitalidades, necrose pulpar sem lesão periapical e com necrose e lesão periapical). Foi verificada a ausência de microrganismos na superfície dos grupos de dentes que apresentavam polpa com vitalidade e naqueles com polpas necrosadas sem lesão periapical, incluindo forames e cimentos intactos. Já no grupo com necrose e lesão periapical, a superfície variava entre normal e com áreas de reabsorção. Neste grupo uma grande quantidade de microrganismos foi encontrada, onde foi observada uma variação entre dentes que eram colonizados apenas por um único morfotipo (cocos, bacilos ou microrganismos filamentosos) ou que apresentavam associação de formas em sua superfície, como no biofilme dental.

Na ausência de tratamento da infecção bacteriana nos canais radiculares esses microrganismos invadem a região do forame e ligamento apical originando diferentes manifestações clínicas: a forma aguda caracterizada pelo abscesso

periapical (também chamada dento-alveolar) e as lesões periapicais crônicas (como a periodontite apical crônica e o cisto periapical de origem inflamatória). Acredita-se que durante o processo infeccioso ocorre uma alteração na população microbiana destes tecidos, onde inicialmente havia uma predominância de bactérias aeróbicas e facultativas Gram-positivas, ocorre uma substituição para bactérias anaeróbicas restritas Gram-negativas, onde as lesões crônicas podem agudizar quando se altera a microflora (DE DEUS, 1992; LEONARDO e LEAL, 1995; NEVILLE et al., 1998)

Após a obturação endodôntica deve-se evitar o contato com os fluídos bucais através dos selamentos oclusais e periféricos, pois se houver contato por períodos longos os tecidos periapicais podem ser recontaminados. Outras vias de ingresso são as cavidades abertas ao meio bucal e túbulos dentinários, pois quando íntegros a dentina e esmalte são impermeáveis aos microrganismos e se estes estiverem rompidos (cárie) e mesmo que o organismo deposite nova camada de dentina à velocidade e profundidade da cárie permitiria a infecção. Mesmo depois de removida a cárie, se a região pulpar estiver muito próxima da restauração e se esta não promoveu uma vedação efetiva daquela cavidade, as bactérias podem por infiltração invadir a polpa (WEINE, 1998).

### 3.2 MICROFLORA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

A boca apresenta mais de 500 espécies bacterianas colonizadoras, e apenas, aproximadamente um número de 15 a 30 espécies têm sido freqüentemente isoladas a partir das infecções endodônticas e periapicais; (LOPES e SIQUEIRA, 2004; COHEN e BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS, 1992; ESTRELA et al., 1994; ESTRELA, 2004). Na Tabela 1 estão sumarizadas aquelas espécies freqüentemente isoladas. Particularmente nos casos de tratamento endodôntico normalmente são isoladas as espécies *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA, 2002).

MILLER, em 1894, sugeriu que espiroquetas seriam os patógenos de maior importância endodôntica. Mesmo hoje se tem dificuldade no cultivo de espécies de algumas espiroquetas. Recentemente com a tecnologia molecular

encontra-se uma alta prevalência de espiroquetas na infecção pulpar e radicular. Particularmente, *Treponema denticula* é comumente encontrada nas doenças periodontais (SIQUEIRA, 2002).

HAAPASALO (1986) selecionou 62 dentes de 57 pacientes de idades variando entre 36 e 42 anos e seguindo o protocolo de isolamento, desinfecção do campo operatório, abertura e acesso aos canais, isolou-se 45 espécies de *Bacteroides* dos 62 canais. Em um único canal foram isolados até quatro diferentes espécies, *B. buccale*, *B. denticola*, *B. oralis* e *B. oris*, verificando que ocorria uma variação no número de espécies encontradas e nos casos de agudização ocorria mais de duas espécies.

SUNDQVIST et al. (1989), isolaram a partir de 72 dentes humanos unirradiculares com necrose pulpar uma diversidade de espécies de *Bacteróides* incluindo *B. intermedius*, *B. endodontalis*, *B. loeschei*, *B. gingivalis* e *B. denticola.*, os quais estavam associados com abscessos agudos com drenagem purulenta e casos assintomáticos. Em apenas um caso sintomático não foi isolado *Bacteróides* obtendo amostras de *Actinomyces israelii* e *A. naeslundii*.

A microflora patogênica parece variar de acordo com a condição em que se encontra a coroa dental. Nos casos de exposição pulpar as bactérias aeróbicas como *Streptococcus sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius* e *S. faecalis* são predominantes. Raramente se isola o *S. pyogenes* com uma porcentagem variável de 0 a 10%. O gênero *Staphylococcus* é encontrado em 30% dos isolados, nos quais 2 a 5% são *S. aureus* e a grande maioria é o *S. epidermidis*. Quando se aprofunda no interior dos canais radiculares em direção ao ápice a tensão de O<sub>2</sub> reduz favorecendo assim o desenvolvimento de bactérias anaeróbicas, das quais são frequentemente isoladas os gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Selenomas* (LOPES e SIQUEIRA, 2004)

Bactérias anaeróbicas pigmentadas negras são isoladas de polpas necrosadas em uma freqüência de 25 a 30%. *Porphyromonas gingivalis* e *P. endodontalis* estão fortemente associados com infecções endodônticas agudas, mas podem ser encontrados nas infecções assintomáticas. O isolamento e identificação de certos microrganismos na infecção endodôntica é limitada, muitas vezes as anaeróbicas



pigmentadas negras presentes na boca são altamente sensíveis ao oxigênio e sua presença subestimada pelas técnicas de cultura. (SIQUEIRA et al., 2001)

TABELA 1 - ESPÉCIES FREQUENTEMENTE ISOLADAS DE INFECÇÕES PULPARES (JORGE et al., 1995)

<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>
<b>Cocos Gram-positivos</b>	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitior</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. milleri</i> , <i>S. sanguis</i> , grupo mutans,
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> ,
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> <i>P. micros</i> , <i>P. anaerobius</i>
<b>Cocos Gram-negativos</b>	
<i>Neisseria</i>	
<i>Veillonella</i>	<i>P. parvula</i>
<b>Bacilos Gram-positivos</b>	
<i>Actinomyces</i>	<i>A. viscosus</i> , <i>A. naeslundii</i> <i>A. israeli</i> , <i>A. odontolyticus</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. matruchotti</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> <i>L. fermentum</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i>
<b>Bacilos Gram-negativos</b>	
<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> , <i>P. denticola</i>
<i>Prevotella</i>	<i>P. melaninogenica</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i>
<i>Selenomonas</i>	
<b>Enterobacteriaceae e relacionadas</b>	
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>Aerobacter</i>	<i>A. aerogenes</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Espiroquetas</b>	
<i>Treponema</i>	<i>T. denticula</i> , <i>T. vincentii</i>
<b>Fungos</b>	
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>

Ando e Hoshino (1990), quantificaram e caracterizaram as bactérias que invadem e contaminam camadas profundas (0,5 – 2 mm da superfície das paredes do canal) da dentina de canais radiculares humanos, teoricamente infectadas com anaeróbicos. A análise foi realizada por meio de uma amostragem aleatória em oito dentes recém extraídos e expostos a CO<sub>2</sub>. De onde foram recuperados 256 tipos de colônias, sendo 80% destas anaeróbicas restritas. Dentre os anaeróbios facultativos isolados verificaram bactérias do gênero *Lactobacillus* (30%), *Streptococcus* (13%) e *Propionibacterium* (9%) e acrescentaram que a microflora das camadas profundas de dentina infectada era relativamente similar àquelas encontradas nas lesões cariosas de dentina coronária.

Baungartner e Falkler (1991), ao realizarem cultura anaeróbica da região apical de raízes de dentes recém extraídos por indicação clínica, obtiveram 50 isolados dos gêneros *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* não pigmentados, *Veillonella*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*. Demonstrando a predominância de anaeróbicos na região apical de dentes com canais infectados, cáries, exposição pulpar e lesões periapicais.

Em um estudo envolvendo amostras retiradas de 53 dentes infectados, sendo 27 com abscesso periapical agudo, Siqueira et al. (2002a) utilizaram a técnica de PCR específica para identificação direta das bactérias presentes no material investigado. Em todas as amostras foram verificadas bactérias dos gêneros: *Streptococcus* (22,6%), *Actinomyces* sp. (9,4%) e *E. faecalis* (7,5%), sendo a espécie mais prevalente a do grupo *Streptococcus anginosus*. Nos casos assintomáticos verificou-se *S. intermedius* (11,5%), *E. faecalis* (11,5%) e *S. anginosus* (7,7%). E nos abscessos foram encontrados *A. guencserial* (14,8%), *S. gordonii* (11,1%), *S. intermedius* (11,1%), *A. israeli* (7,4%), *S. anginosus* (7,4%) e *S. sanguis* (7,4%).

Siqueira e Roças (2002) utilizando ribotipagem seguido de PCR específica em amostras de 32 dentes com polpas necrosadas e lesão periapical (assintomáticos e abscedados), verificaram em 77,3% dos casos assintomáticos e 40% dos sintomáticos a presença da bactéria *Dialister pneumosintes*. Esta é

caracterizada como um bacilo Gram-negativo imóvel, não esporulada, anaeróbica estrita e associada com algumas infecções no corpo humano. Ainda nesse estudo, através da técnica de PCR específica foram comparadas amostras de dentes infectados com e sem sintomatologia, investigando uma possível associação de *D. pneumosintes* com outras bactérias. Os resultados indicaram a ocorrência de uma associação verificando espécies como *Treponema denticola*, *T. pectinovorum* e *T. vincentinii* *P. endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Compylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, e os autores sugeriram que a sintomatologia provavelmente não está especificamente relacionada, a presença da bactéria *D. pneumosintes*, mas sim em função da associação detectada.

A associação entre as bactérias dos gêneros *Bacterioides forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram evidenciadas por meio de PCR a partir de amostras de polpas necrosadas com lesões perirradiculares, onde os autores identificaram a presença de *T. denticola* em 44% dos casos, *P. gingivalis* (30%) e *B. forsythus* (26%) (RÔÇAS et al., 2001).

Siqueira et al. (2002b) seccionaram e infectaram com *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae* raízes dentinárias de origem bovina. Após 14 dias as secções foram divididas em duas metades e estas preparadas para eletromicrografia de varredura. Apenas formas leveduriformes com e sem brotamentos foram observadas. *C. albicans* colonizou a maior parte dos espécimes. Em quanto às outras espécies apresentaram uma colonização restrita ou ausente no tecido investigado. A *C. albicans* promoveu infecção desde os tecidos superficiais até invasão dos túbulos dentinários. Sendo assim observou-se que a *C. albicans* é hábil a colonizar a dentina diferente das demais espécies estudadas. Tal achado pode justificar o fato desta espécie ser a mais comumente encontrado em infecções endodônticas.

Peters, Wesselink e van Winkelhoff (2002) avaliaram por meio de análises estatísticas utilizando o teste de Fisher's e o calculo de Odds amostras bacterianas obtidas a partir de 58 canais radiculares cultivados em anaerobiose. Em 87% dos canais, os isolados eram *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* e *Actinomyces odontolyticus*. Onde era verificado canais multicolonizados

sendo as associações entre as espécies *P. intermedia* e *P. oralis* e as envolvendo *P. intermédia*, *P. micros* e *A. odontolyticus*, as mais freqüentes e estatisticamente significativas. A partir destes resultados os autores evidenciaram que os patógenos não ocorriam de forma aleatória, mas em combinações específicas, as quais provavelmente contribuíam para o desenvolvimento dos sinais e sintomas clínicos.

### 3.3 FORMAS DE TRATAMENTOS

Atualmente o objetivo do tratamento endodôntico é neutralizar os produtos tóxicos e controlar o número e virulência de microrganismos colonizadores do sistema de canais radiculares, utilizando nas soluções irrigadoras agentes bactericidas e oxidantes enérgicos como coadjuvantes no preparo biomecânico e aplicações tópicas como curativos de demora entre sessões (LEONARDO e LEAL, 1995).

Para os casos de necrose pulpar, gangrena, periodontite apical aguda infecciosa e abscesso dentoalveolar agudo levado a cronicidade se recomenda a instrumentação complementada pela irrigação/aspiração com soluções bactericidas suaves como o hipoclorito de sódio 1% (solução de Milton), pois nesses casos a infecção está restrita a luz do canal.

Nos casos com alterações crônicas do periodonto, como granulomas, abscessos crônicos, abscessos fênix levados a cronicidade e sugestivo de cisto onde o canal encontra-se concentrado de colônias bacterianas (Gram negativas anaeróbicas) e endotoxinas, a solução preconizada deve ser bactericida (como por exemplo, a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% ou hipoclorito de sódio a 4-6%, com ação fortemente oxidante) visando a neutralização coroa-ápice sem pressão. Porém durante o preparo biomecânico a solução indicada é o hipoclorito de sódio 2,5% (solução de Labarague) (LEONARDO e LEAL, 1995).

No entanto a utilização de diferentes concentrações da solução irrigadora não atinge bactérias que infectam profundamente os túbulos dentinários e as lesões periapicais assim como o biofilme, então se recomenda o uso de “curativo de demora” a base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina entre as

sessões. Para isso, os canais radiculares devem estar preparados pela instrumentação biomecânica (LEONARDO e LEAL, 1995).

O hidróxido de cálcio tem um grande destaque como medicação intracanal por atuar na inibição enzimática bacteriana e induzir a ativação enzimática tecidual no reparo. O hidróxido de cálcio é uma base forte, obtido a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio até sua formação em óxido de cálcio (cal viva). Com a hidratação se obtém o hidróxido de cálcio. Sua propriedade antimicrobiana é devida liberação de íons hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) elevando o pH a altos valores próximos de 12,6. Assim, consegue-se alterar o metabolismo enzimático das bactérias e afeta direta e indiretamente o transporte químico através da membrana citoplasmática. Quando a exposição por longos períodos a altos valores de pH, a atividade enzimática bacteriana torna-se inativa irreversivelmente. A utilização da pasta de hidróxido de cálcio como medicação assegura, ao mesmo tempo, o preenchimento do canal e reparo biológico por suas propriedades específicas. Seu pH neutraliza o meio ácido do ápice radicular inibindo a atividade dos osteoclastos (NELSON et al., 2002; ESTRELA et al., 1994).

Infecções fúngicas são geralmente associadas às infecções secundárias e persistentes. Apoiado nestas descobertas SIQUEIRA et al., 2003 utilizam cilindros de dentina bovina contaminada para testar 4 diferentes medicações: hidróxido de cálcio/glicerina, hidróxido de cálcio/clorexidina 0,12%, hidróxido de cálcio/paramonoclofenol/glicerina e clorexidina 0,12%/óxido de zinco. Os tempos de exposição às medicações foram de uma hora, dois dias e sete dias. Posteriormente, incubaram os espécimes para avaliar o crescimento dos fungos que resistiram. Nos resultados, as medicações hidróxido de cálcio/paramonoclofenol /glicerina e clorexidina/óxido de zinco desinfetaram os espécimes com uma hora de exposição, hidróxido de cálcio/glicerina foi efetivo com sete dias e hidróxido de cálcio/clorexidina 0,12%, mesmo depois de uma semana, não teve resultados satisfatórios.

A atividade antimicrobiana das soluções irrigantes Endoquil (óleo detergente de castor), clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 0,5% foram testados frente a cocos Gram-positivos (*Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S.*

*epidermidis*, *S. mutans* e *S. sobrinus*), bacilos Gram-negativos (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e *C. albicans*. Os testes foram realizados em duplicata na técnica de difusão em ágar baseado nos halos de inibição, obteve-se inibição total com clorexidina 2%, o Endoquil foi eficaz apenas com Gram-positivas, o hipoclorito apenas frente *S. aureus* (LEONARDO et al., 2001).

Souza *et al.* (1989) realizou o tratamento endodôntico conservador em 50 dentes que apresentavam lesões periapicais, onde o preparo biomecânico foi realizado na primeira sessão com a colocação da pasta de hidróxido de cálcio restrito ao interior do canal radicular. Subseqüentes trocas da pasta foram realizadas em intervalos de 2 semanas entre sessões até que radiograficamente a lesão encontra-se reparada o que ocorreu em 47 dos 50 casos.

Soares e César (2001) utilizaram técnicas endodônticas “step down” e “step back” associadas a irrigação com hipoclorito de sódio 5% para obter resultados microbiológicos negativos em tratamentos endodônticos de sessão única (com início e término do tratamento em único atendimento) e não observaram relação direta ao tipo de reparo (total ou parcial) das lesões periapicais.

Souza (2001) realizou procedimentos de desgaste e alargamento de toda extensão do canal inclusive do forame apical associando o uso de medicação de demora (hidróxido de cálcio) quando o canal se apresentava contaminado e envolvido com lesão periapical que ao respondeu a tratamentos endodônticos conservadores. Durante o período de ação da medicação de demora não houve sintomatologia dolorosa nos pacientes tratados levando assim a obturação dos canais e durante o acompanhamento observou o reparo ósseo total dos casos tratados.

No tratamento de lesões refratárias os procedimentos endodônticos não devem restringir-se apenas ao canal principal e para isso fármacos com ação nas regiões periapicais para desinfecção e indução do reparo são necessários. Dentre os produtos usados estão o iodofórmio e o hidróxido de cálcio. Quimicamente, o iodofórmio corresponde ao triiodometano ( $\text{CHI}_3$ ) ou triiodeto de formol, estes apresentam alto teor de iodo, entorno de 96%. Pode

ser facilmente dissolvido em álcool, éter ou gorduras liberando iodo nascente com atividade antimicrobiana. Pela sua dissolução e liberação de iodo em gorduras explica sua ação anti-séptica quando em contato com áreas infectadas. O iodofórmio foi abandonado por reações adversas como dor penetrante, alteração na cor dos dentes em tratamento, e sintomatologias dolorosas são observadas nos pacientes alérgicos ao iodo (DANIEL et al., 1999).

### **3.3.1 Tratamentos Alternativos**

O uso do laser em odontologia foi sugerido há aproximadamente 35 anos como um meio de energia luminosa para remover e modificar tecidos moles e duros (AAE-LASSERS IN DENTISTRY, 2003).

EDUARDO e GOUW-SOARES (2001) informaram que em endodontia a laserterapia tem sido usada como tratamento coadjuvante para aumentar o índice de sucesso no procedimento clínico. De acordo com MYERS e MCDANIEL (1991) as vantagens do laser sob os métodos convencionais incluem mínima destruição celular e edema, hemostasia, aumento visual do campo visual cirúrgico e diminuição da dor no pós-operatório. Adicionalmente é possível realizar procedimentos sem a necessidade de anestesia.

Gomes (2003) coletou microrganismos da polpa necrosa de um dente canino inferior esquerdo. Os isolados foram cultivados e em seguida divididos em dois grupos: controle e irradiado por laser. O material irradiado era submetido a sucessivas exposições no período de quatro horas durante 24 horas sob diferentes potências. Como resultado, observou-se o expressivo decréscimo microbiano na 20<sup>a</sup> hora, utilizando 3,0 W de potência por 360 segundos de radiação. Nenhuma potência foi capaz de reduzir a atividade microbiana até a 16<sup>a</sup> hora.

O laser pulsado de Nd:YAG foi introduzido em Odontoestomatologia nos anos 90, essencialmente para tratamento de bolsas periodontais. A técnica é realizada pela inserção de uma fibra entre a gengiva e o dente resultando na desinfecção da área tratada e na estimulação dos tecidos em volta, causando

uma adesão renovada entre a gengiva e o colo dentário. Outra aplicação é na desinfecção e no esvaziamento dos canais radiculares pela introdução de uma fibra que, quando irradiada por energia laser, vaporiza e desinfeta o canal, eliminando o risco de dano apical garantindo um completo esvaziamento e esterilização (MEDICAL LASER, 2003).

Hardee *et al.* (1994) realizaram um estudo sobre a ação antimicrobiana do laser Nd:YAG comparado ao hipoclorito de sódio (NaOCl). Os dentes esterilizados em óxido de etileno e inoculados com esporos de *Bacillus stearothermophilus* eram divididos em grupos e expostos aos tratamentos com irradiação pelo laser pulsado de Nd:YAG ou a 0,5% de NaOCl ou a uma combinação de ambos.. A análise dos resultados indicou uma redução de 2 log<sub>10</sub> em unidades formadoras de colônias, nos diferentes grupos tratados, quando comparados com o controle, mas nenhum dos canais radiculares tratados foi esterilizado.

Fegan e Steiman (1995), também estudaram a desinfecção dos canais radiculares após inoculação com *B. stearothermophilus* com o laser de Nd:YAG e verificaram que em todos os grupos tratados com solução de NaOCl, o crescimento desse bastonete foi efetivamente inibido. A instrumentação manual e a ultrassônica com água destilada esterilizada não desinfetou os canais enquanto que o laser de Nd:YAG inibiu o crescimento de *B. stearothermophilus*.

Porém, embora comprovada a eficácia do laser em tratamentos endodônticos o método apresenta algumas limitações. LAN *et al.* (2000) verificaram mudanças morfológicas na superfície dentinária após a irradiação com os lasers Nd:YAG e CO<sub>2</sub>. Da mesma forma SOUZA-GUGELMIN *et al.* (2001) verificaram uma clara vitrificação da superfície, túbulos dentinários abertos e ainda algumas crateras superficiais e rachaduras após radiação com laser Nd:YAG e acrescentaram que embora os “smear layer”<sup>1</sup> e os debris fossem removidos com o laser, a limpeza da parede do canal radicular era difícil. Além disso a aplicação do método implica num alto custo operacional

O gás ozônio é uma variedade alotrópica do oxigênio, que em medicina sua utilização é conhecida como ozonoterapia, onde o ozônio é sintetizado por geradores medicinais a partir do oxigênio puro. Sua utilização é trinta vezes

---

<sup>1</sup> Smear Layer – lama dentinária formada por restos minerais e orgânicos de dentina, bactérias e tecido pulpar.



inferior àsquelas para fins industriais. Devido sua instabilidade o gás deve ser incorporado a fluidos, como, por exemplo, óleos vegetais e água (SIQUEIRA et al., 2000). Em endodontia a aplicação recomendada para uso tem sido na forma de óleo ozonizado,

Segundo Nagayoshio *et al.* (2004) o ozônio ou solução aquosa de ozônio destroem a parede celular e membrana citoplasmática de bactérias e fungos causando sua destruição. Em seu estudo os autores verificaram o efeito da água ozonizada contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* em infecções “*in vitro*” de dentinas bovinas. Depois da irrigação com a água a *E. faecalis* e o *S. mutans* tiveram sua viabilidade reduzida. Sugerindo a real utilização da água ozonizada na terapia endodôntica.

Velano *et al.* (2001) verificou que a utilização de uma água previamente ozonizada, em gerador de ozônio, é capaz de matar 99% dos *S. aureus* presentes em uma suspensão bacteriana. Em comparação com a ozonização da água após a inoculação da bactéria, a água ozonizada previamente teve ação em menor tempo que a não previamente ozonizada.

Siqueira *et al.* (2000) verificaram em difusão em ágar a inibição das bactérias *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sorbinus*, *S. pyogenes*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* e *Pseudomonas aeruginosa* frente a óleo ozonizado, pasta de hidróxido de cálcio, pasta de hidróxido de cálcio acrescida de tricresolformalina e pasta de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol. E os resultados mostraram que a maior inibição foi para o óleo ozonizado, evidenciando assim a possibilidade de utilização deste composto como medicação intracanal.

Nagayoshi *et al.* (2004), investigaram o efeito bactericida de água ozonizada frente a bactérias invasoras de túbulos dentinários e simultaneamente avaliaram a citotoxicidade da solução em células mamárias. A partir dos resultados concluíram que embora a mistura fosse bactericida e com baixo grau de toxicidade demonstrando uma aplicabilidade alternativa na desinfecção de canais, existia ainda uma longa distancia até a aplicação rotineira do método, devido à falta de testes de referência quanto à toxicidade e efeitos colaterais células humanas.

A fitoterapia tem se tornado cada vez mais popular entre os povos de todo

o mundo. Há inúmeros medicamentos no mercado que utilizam em seus rótulos o termo "produto natural". Produtos à base de ginseng, carqueja, guaraná, confrei, ginko biloba, espinheira-santa e sene são apenas alguns exemplos. Eles prometem, além de maior eficácia terapêutica, ausência de efeitos colaterais. Grande parte utiliza plantas da flora estrangeira ou brasileira como matéria-prima. Os medicamentos à base de plantas são usados para os mais diferentes fins: acalmar, cicatrizar, expectorar, engordar, emagrecer e muitos outros.

É essa utilização das plantas para o tratamento de doenças que constitui, hoje, um ramo da medicina conhecido como fitoterapia. A fitoterapia, apesar de ser considerada por muitos como uma terapia alternativa, não é uma especialidade médica, como a homeopatia ou a acupuntura, e se enquadra dentro da chamada medicina alopática (SILVA et al, 2007).

O uso das plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto a própria humanidade. Nas Ilhas Oceânicas, por exemplo, há séculos a planta kava kava (*Piper methysticum*) é usada como calmante. Durante muito tempo, foi utilizada em cerimônias religiosas, para um tipo de "efeito místico". Depois, cientistas alemães comprovaram que seu extrato tem efeito no combate à ansiedade (CARLSON, DOUGLAS e ROBERTSON, 1948).

Tratamento usando princípios ativos derivados de plantas tem sido reafirmado nos últimos anos devido ao aumento de testes envolvendo avaliação de ação, citotoxicidade e aplicabilidade visando à validação científica (MELO JUNIOR et al., 2002). De acordo com FERREIRA (1996), a prescrição de fototerápicos ocorre em uma percentagem de 5% em relação as totais realizadas no Brasil. Entretanto diversos estudos indicam o aumento no uso de plantas como alternativa ou complemento ao uso das drogas sintéticas medicinais (SIMÕES, 1989).

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos direto ou indiretamente de fontes naturais, especialmente de plantas incluindo entre outros a morfina, a pilocarpina, os curalis, a quinina e a atropina escopolamina (CALIXTO e YUNES, 2001).

De maneira geral as plantas sintetizam substâncias aromáticas tais como fenóis e derivados que apresentam possíveis mecanismos de ação terapêutica.

Os óleos voláteis estéris ou essência quimicamente constituída de derivados fenil propanóides e terpenóides são encontrados em grandes concentrações principalmente na fase que antecede a floração das plantas e apresentam uma diversidade de ação farmacológica entre elas ação anti-sépticas (SIMÕES, 2004).

Duarte *et al.*, 2005 obtiveram óleos essenciais e extratos etanólicos de folhas e/ou caules de 35 plantas medicinais comumente utilizados no Brasil para avaliar suas atividades contra *Cândida albicans*. O óleo foi obtido por destilação em água usando um sistema tipo Clevenger. 13 óleos tiveram atividade contra *Candida albicans* sendo *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon mortini*, *Cymbopogon winterianus*, *Cyperius articulatus*, *Cyperius rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *Mikania glomerata*, *Mentha piperita*, *Mentha sp*, *Stachys bysantina* e *Solidago chilensis*. Os extratos etanólicos não tiveram ação em nenhuma das concentrações testadas.

A atividade fungistática máxima do óleo de *Schinus molle*, uma planta da família das *Anacardiaceae* foi observada durante testes entre outros óleos essenciais frente a fungos ambientais e patógenos de animais. Sua ação foi efetiva contra todos patógenos animais e razoável contra os ambientais. As concentrações de atividade variavam entre 200 a 900 ppm. Sua toxicidade se mantém em temperaturas até 80° C ou 90 dias de estocagem, mas decai quando autoclavadas. O óleo exibiu um espectro de ação estreito e foi mais efetivo que Multifungin, uma droga antifúngica (DIKSHIT *et al.*, 1999).

A utilização de fitoterápicos em odontologia tem sido concentrada principalmente no controle do biofilme dental associadas a carie e doença periodontal (MELO JUNIOR *et al.*, 2002).

### 3.4 *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)

*Schinus terebenthifolius* Raddi popularmente conhecida como aroeira é um vegetal nativo no Brasil que apresenta propriedades medicinais e o extrato de sua casca e caules tem sido investigado quanto a ação farmacológica (LISBOA NETO, 1998, MELO JUNIOR *et al.*, 2002, RIBAS *et al.*, 2006; BRANCO NETO *et al.*, 2006)

*S. terenthifolius* Raddi da família *Anacardiaceae* tem como sinônimos, *Schinus mole* Lineu, *Schinus aroeira* Vell, *Schinusanthartica velosa*, *Schinus mucromulata* Mart e *Schinus rhoifolus* Mart. Popularmente é chamada de aroeira da praia, aroeira vermelha, aroeira mansa e careiba. Cultivada na América do Sul pela extração da resina de seu tronco, é constituída de arbustos de três a quatro metros de altura com ramos de largura e diâmetro variável, casca grossa e escura, copa ovóide e folha imparipinadas (LIMA et al., 2004; MARTINEZ et al., 1996; GUERRA et al., 2000; AMORIM e SANTOS, 2003).

As cascas das árvores, da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, apresentam-se como fragmentos de comprimento variável, pardos externamente e avermelhados na face interna. Fornece madeira parda ou amarelo-clara, mole, porém pesada e bastante resistente considerada por alguns autores incorruptível, aproveitada para esteios, mourões, lenha e carvão. O cheiro é resinoso o sabor é adstringente (devido ao tanino) e balsâmico (CORRÊA, 1926; BALBACHAS, 1960; PACIORNIK, 1990; JORGE e MARKMANN, 1996; LORENZI, 2002; PLANTAS MEDICINAIS, 2007).

As principais características morfo-histológicas e químicas da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, com vistas ao seu reconhecimento laboratorial como droga, são que as folhas e as cascas revelaram-se ricas em taninos e em óleo essencial. Saponinas ocorrem restritas às cascas. A composição fenólica das cascas é diferente da composição fenólica das folhas (JORGE e MARKMANN, 1996).

Esta espécie possui importância comercial por se tratar de uma planta com propriedades medicinais. Têm um destaque ecológico em programas de reflorestamento ambiental, recuperação de áreas degradadas, projetos de reposição de mata ciliar e estabilização de dunas. Fornece madeira parda ou amarelo-clara bastante resistente, utilizada na construção civil. As partes utilizadas popularmente são: cascas, folhas e frutos, apresentando várias ações medicinais. São elas: adstringente, anti-diarréica, anti-inflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. Não é utilizada na cosmetologia. Devido à composição de seu óleo essencial, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios. Popularmente, também é empregada no tratamento de inflamações, para

promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas em geral. Da casca extrai-se um óleo empregado, o “azeite de aroeira”, contra tumores e doenças da córnea.

Outros estudos mostraram que extrato da casca de *S. terebenthifolius* é indicado no tratamento de estomatites, usado externamente como anti-séptico, bem como apresentou atividade na regeneração tecidual (XAVIER, 1995; SIMÕES, 1989).

As cascas e folhas são utilizadas também no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, inflamação uterina, infecção do trato urinário, gastrintestinal, e respiratório (LIMA et al., 2004; MARTINEZ et al., 1996; GUERRA et al., 2000) e na pele e mucosas ulceradas (LIMA et al., 2004). O extrato fracionado subdivide seus componentes em ação antiinflamatória não esteróide por inibição da fosfolipase A como no caso de urundeuvinas A e B, o schinol e o ácido masticadienólico. A ação antimicrobiana é verificada pela terebinthona, ácido hidromasticadienólico, ácido terebinthifólico e o ácido ursólio (KAISTHA e KIER, 1962; CAMPELLO E MARSALOLI, 1975; AMORIM e SANTOS, 2003; LIMA et al., 2004). Outros constituintes majoritários são os taninos (LIMA et al., 2004).

Amorim e Santos (2003) estudaram a capacidade do gel de aroeira de eliminar os agentes patógenos da vaginose bacteriana. No estudo 48 mulheres com vaginose bacteriana sintomática foram incluídas em ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado. Nas avaliações estavam; taxa de cura, presença de lactobacilos na colpocitologia pós-tratamento. A taxa de cura foi de 84% no grupo aroeira e 47,8% no placebo. Observou-se freqüência maior de lactobacilos entre as pacientes tratadas (43,5%) e (4,3%) no placebo. Não houve efeitos adversos em ambos os grupos. Assim o gel de aroeira mostrou eficiência e segurança no tratamento, com potenciais efeitos benéficos na flora vaginal.

Martinez; González e Badell (1996) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato fluido (etanólico a 30%) de folhas de *S. terebenthifolius* Raddi com uma bateria mínima de linhagem de microrganismos como *S. aureus*, *Bacillus subtilis* (Gram-positivas) *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gram-negativas) e *C. albicans* (levedura) por difusão em ágar. Em concentrações menores de 10% do extrato não se teve nenhuma inibição aos microrganismos.

Com concentrações de 50 e 100% as bactérias Gram-positivas e negativas foram inibidas, mas o mesmo não ocorreu com *C. albicans*.

O uso das preparações de folha e casca se reporta à medicina tradicional contra diversas doenças. Com a idéia de utilizar o extrato de *S. terebenthifolius Raddi* como terapêutico, avaliou-se a atividade antimicrobiana do extrato fluido a 80% (de etanol) das folhas. Para o teste utilizou-se a difusão em ágar frente bactérias Gram-positiva *S. aureus*, Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* e levedura *C. albicans* e, após o cultivo, observou-se a inibição dos microrganismos desde a concentração 1% até 80% com crescimento progressivo dos halos de inibição. Inclusive a *C. albicans* apresentou inibição do crescimento no extrato a 80% de etanol (GUERRA et al., 2000).

Lima *et al.* (2004) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. terebenthifolius*, obtido de caules e folhas frente às linhagens referência de *S. aureus* ATCC6538, *S. epidermidis* ATCC12228, *Bacillus cereus* ATCC14579, *E. coli* ATCC11105, *P. aeruginosa* ATCC10145, *C. albicans* ICB12, *C. tropicalis* FCF163, *Cryptococcus neoformans* FCF119, *Trycophyton rubrum* LM54, *Microsporium canis* LM72 e *Ephydermophyton flocosum* LM27, utilizando o teste de difusão em ágar. Dos microrganismos testados *E. coli*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* não apresentaram sensibilidade ao extrato os demais foram sensíveis. Segundo os autores a atividade antimicrobiana possivelmente está associada a compostos químicos como taninos, e outros de menor quantidade como alcalóides, esteróides, chalcones e urundevinas.

A eficiência antimicrobiana de diversos extratos alcoólicos de plantas com potencial medicinal incluindo a *S. terebenthifolius Raddi* foi testada em microrganismos isolados de alveolites humanas e induzidas em animais (ratos), onde se verificou que entre os extratos etanólicos testados o de *S. terebenthifolius Raddi* foi o que apresentou os melhores resultados frente bactérias Gram-positivas e negativas (MELO et al., 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS REFERÊNCIA

As bactérias utilizadas como linhagens referência foram:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 27213 encontrados no Departamento de Patologia Básica no Setor de Ciências Biológicas da UFPR.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 encontrados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica no Setor de Ciências Biológicas da UFPR.
- *Escherichia coli* ATCC 35219 encontrados no Departamento de Patologia Básica no Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

### 4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS A PARTIR DE POLPAS DENTAIS NECROSADAS

As polpas dentais necrosadas ou o conteúdo séptico dos canais foram obtidos de 17 dentes de pacientes atendidos nos serviços de Pronto Atendimento Odontológico da UFPR e PUC-PR, os quais eram avaliados e diagnosticados e necessitaram de abertura coronária, saneamento e medicação intracanal. As condições dos dentes foram as mais variadas desde cáries ativas, restaurações com ou sem infiltração marginal e trauma dentário.

O paciente foi submetido à anestesia utilizando fenilefrina em lidocaína 2% (<sup>®</sup>Novocol<sup>2</sup>), seguido do isolamento absoluto. Em peça de mão de alta rotação com o mínimo de refrigeração para evitar que grande quantidade de água não esterilizada se difundisse no canal até a trepanação. Posteriormente, substituiu-se a ponta diamantada em alta rotação por broca de Batt em baixa rotação sem irrigação para remoção do teto da câmara pulpar também para não permitir a

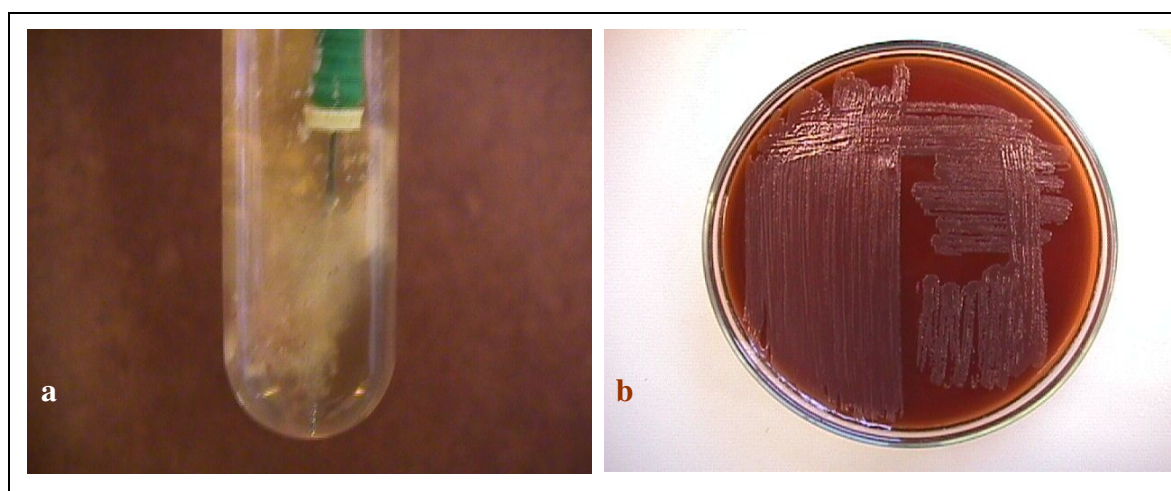
---

<sup>2</sup> SSWHITE artigos dentários Ltda. Rua Senador Alencar, 160 Rio de Janeiro – RJ. Lote: 0951206

entrada da água no canal em tratamento. Finalizada a abertura com uma lima endodôntica <sup>®</sup>Flexofile<sup>3</sup> n° 15, introduziu-a até o comprimento aparente do dente (obtido na radiografia periapical de diagnóstico menos 3 mm) e com movimentos de um quarto de volta com pequeno retrocesso o material foi retirado na lima e esta submersa em meio líquido redutor tioglicolato para um primeiro crescimento das bactérias extraídas. Os casos que apresentavam coleção purulenta, esta era coletada com pontas de papel absorvente de diâmetro n° 15 e posteriormente imersas junto com o instrumento (Figuras 1a e 1b) (SIQUEIRA et al. 2002a).

Posteriormente, com auxílio de alça e pipetas as colônias foram semeadas em ágar simples e ágar BHI-S para novo cultivo. A partir desse cultivo as bactérias foram isoladas de acordo com sua morfologia de colônia purificando assim uma única espécie na placa de cultivo (Figuras 1c e 1d).

FIGURA 1 - ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDODÔNTICAS A PARTIR DE POLPAS NECROSADAS



**Legenda:** a: Aspecto do crescimento inicial das bactérias isoladas em tioglicolato. b: aspecto do crescimento do isolado bacteriano em meio sólido BHI-Suplementado

Após o crescimento em placas de BHI-S <sup>4</sup>as colônias foram identificadas presuntivamente por morfologia utilizando a coloração de Gram. As bactérias com morfologias de cocos Gram-positivas compatíveis com bactérias do gênero

<sup>3</sup> Maillefer Instruments – Ballaigues, Suíça. Importado por Dentsply Ind. e Com. Ltda. Rua Alice Hervê, 86 – Bingen – Petrópolis – RJ. Lotes 3144260; 9599460; 9377970 e 0037840

<sup>4</sup> Meio *Brain Heart Infusion* (Infusão de Coração e Cérebro Bovino).



*Staphylococcus* foram repicadas em ágar sangue de carneiro, ágar Chapman (ágar manitol-sal) e incubadas a 36 ° C por 24 horas. Para as colônias que tiveram o crescimento positivo foram realizados testes bioquímicos de fermentação do manitol, coagulase em tubo, prova de Voges-Proskauer (VP) e teste de sensibilidade ao antibiótico NovoBiocina 5 (KONEMAN, 2001).

As bactérias com morfologia de bacilos Gram-negativos foram repicadas em meio ágar Teague, ágar Cetrimide (Brometo n-cetiltrimetilamônia), ágar P e foi realizada a prova da oxidase (KONEMAN, 2001).

#### 4.3 COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS DA *S. terenbenthifolius* Raddi

Para a pesquisa foram utilizados dois extratos da planta catalogada e identificada no Museu Botânico Municipal de Curitiba com o número 285803, mas obtidos em épocas distintas e por equipes distintas.

O primeiro extrato foi obtido por RIBAS e colaboradores no ano de 2002 na região da litorânea do Paraná, seu armazenamento foi em um frasco âmbar com rosca, contendo aproximadamente 1,5 L de extrato bruto (total).

A segunda amostra foi coletada da mesma reserva da região litorânea do Paraná, em setembro de 2005, e seu extrato foi preparado pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná e pelo Departamento de Química da mesma Universidade.

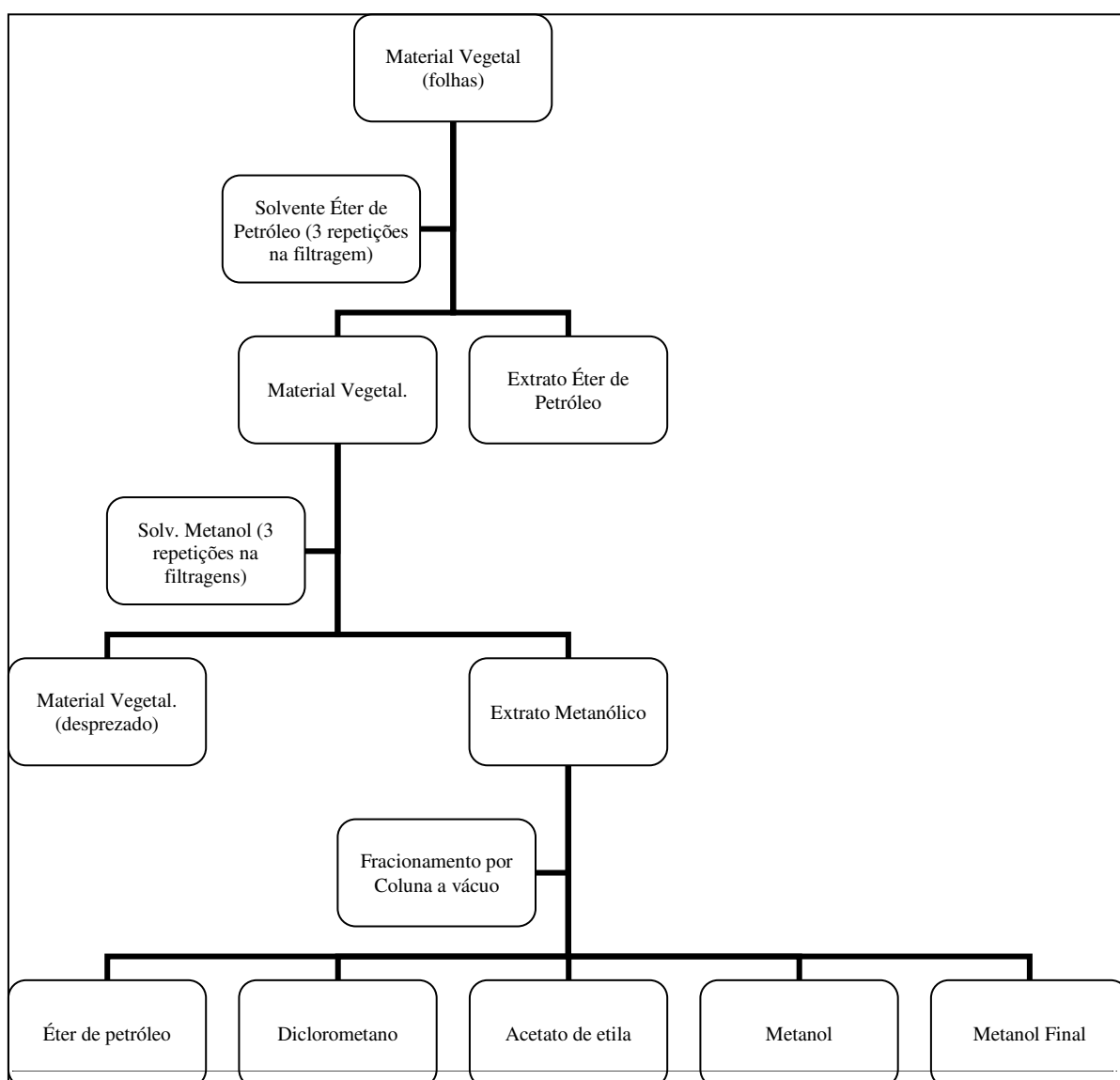
As folhas foram trituradas em moinho e pesadas, depois de secas a 40 °C.

##### 4.3.1 Extração com Éter de Petróleo e Metanol

As folhas moídas e secas (650g) foram colocadas em um Erlenmeyer de 3L e este foi preenchido com um volume de éter de petróleo que correspondia a uma vez e meia a altura da amostra. Após dois dias, o extrato foi retirado por filtração em funil simples com algodão e reservado. O mesmo volume de éter de petróleo foi acrescentado ao Erlenmeyer contendo as folhas. Dois dias depois, o procedimento foi repetido, totalizando três extrações. Os extratos foram reunidos e concentrados no evaporador rotativo, fornecendo 13,8g do extrato éter de

petróleo (EEP). Continuando a extração das folhas, estas foram agora extraídas com metanol, da mesma forma que descrito acima. Os extratos foram reunidos e concentrados fornecendo 28,2g do extrato metanólico (EM) (HARBORNE, 1998).

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi



### 4.3.2 Fracionamento em Coluna a Vácuo

O extrato metanólico (10g) foi fracionado em coluna a vácuo, utilizando gel de sílica 60 (0,063 – 0,200mm) e gradiente de solventes para eluição. Inicialmente se realiza o preparo da amostra (extrato metanólico adicionado a sílica numa proporção de 1:2), e esta mistura foi colocada no topo da coluna, a qual previamente foi empacotada com sílica (20 vezes o peso do extrato) e hexano. A seguir foram aplicados os solventes, começando do mais apolar para o mais polar, fazendo um gradiente de volume constante. O volume de cada solvente foi de 250 ml. O primeiro gradiente foi éter de petróleo 100%, seguido de éter de petróleo e diclorometano 1:1, diclorometano 100%, diclorometano e acetato de etila 1:1, acetato de etila 100%, acetato de etila e metanol 1:1 e finalmente, metanol 100%. O líquido eluído da coluna foi coletado em balões, que são levados ao evaporador rotativo, fornecendo as frações. Cada fração foi então transferida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur para um frasco menor, devidamente rotulado para indicar o(s) solvente(s) do gradiente em questão (HARBORNE, 1998).

## 4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* FRENTE AO EXTRATO DE AROEIRA

### 4.4.1 Preparação do Inóculo

Os microrganismos aeróbicos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*) foram subcultivados em placas de Brain Heart Infusion Agar (BHI), incubados em atmosfera de O<sub>2</sub> por 48 horas.

Após o crescimento em meio sólido, colônias crescidas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans* foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI caldo. Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada no espectrofotômetro com absorvância de 800 nm, até atingir a concentração (transmitância 90) equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC).

#### **4.4.2 Efeito Antimicrobiano do Extrato Bruto e Fracionado**

O teste antimicrobiano foi realizado em meios sólidos acrescidos dos extratos em diferentes concentrações, assim como em meios líquidos por micro diluição.

##### **4.4.2.1 Efeito antimicrobiano do extrato bruto e fracionado em meio sólido**

Para o teste em meio sólido acrescentou-se antes da solidificação do meio (quando este estava a uma temperatura de aproximadamente 60°C), diferentes volumes, desde 0 mL a 10 mL (v/v), dos extratos brutos e fracionados (soluções 30% e 80% à concentração de 10.000 µg/mL), visando identificar a concentração inibitória mínima dos extratos para cada cultura. O inóculo consistia de um volume de 10 µL das culturas (de cada linhagem testada) na concentração de 10<sup>4</sup> células/mL. Em seguida foi realizada a incubação por 48 horas e o crescimento avaliado baseando-se nas UFC/mL.

Placas contendo o meio e a solução hidroalcoólica a 80% e 30% foram utilizadas como controle.

##### **4.4.2.2 Efeito antimicrobiano do extrato bruto e fracionado em meio líquido**

Para o teste de atividade antimicrobiana em meio líquido, uma solução base foi obtida a partir do extrato seco (bruto e fracionado) das plantas, coletadas no ano de 2002 e do extrato fracionado no caso das plantas coletadas em 2005. Para cada extrato foi preparado duas soluções base hidroalcoólicas diferentes diluindo 100 mg em 10 mL de etanol 30% e 80% em água destilada esterilizada, respectivamente. Obtendo assim, duas soluções na concentração de 10.000 µg de extrato /mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em frascos tipo “Eppendorfs” contendo 100 µL de caldo BHI-S, obtendo oito diluições decrescentes até a concentração final de 156,25 µg/mL (10<sup>-8</sup>).

Paralelamente, para cada linhagens referencia e isolados testados, um volume de 100 µL da cultura na concentração final de 10<sup>4</sup> células/mL (baseada na

escala de McFarland), foi inoculado nas diluições de 5.000 µg/mL até 156,25 µg/mL ( $10^{-8}$ ) dos extratos hidroalcoólicos 30% e 80%(extrato bruto e frações), e os inóculos incubados por 48 h à 37°C. Após este período, para as diferentes culturas 10 µL de cada diluição, foi plaqueado em meio ágar simples e depois de 48 horas de incubação realizada a leitura baseada nas UFC/mL.

#### **4.4.2.3 Avaliação em meio líquido do efeito antimicrobiano da associação das diferentes frações do extrato bruto**

Para verificar a ação antimicrobiana das frações associadas foram preparados meios contendo em ordem crescente o número de frações na concentração de 2.500 µg/mL.

Para o ensaio foram utilizados tubos tipo “Eppendorf” contendo um volume final de 200 µL do meio líquido mais as frações do substrato associadas, onde partiu-se da combinação mínima de Acetato mais Metanol, acrescentando seqüencialmente em cada tubo, as frações diclorometano, éter de petróleo e fração final.

Em cada associação, um volume de 200µL do inóculo das diferentes culturas testadas foi adicionado e as culturas incubadas a 37°C por 48 horas em aerobiose. Após o período de incubação, alíquotas de 10µL dos meios foram plaqueadas e novamente incubadas para posterior leitura baseada nas UFC/mL.

#### **4.4.3 Avaliação da Ação Antimicrobiana do Extrato Utilizando um Modelo “*in vitro*” de Infecção Endodôntica**

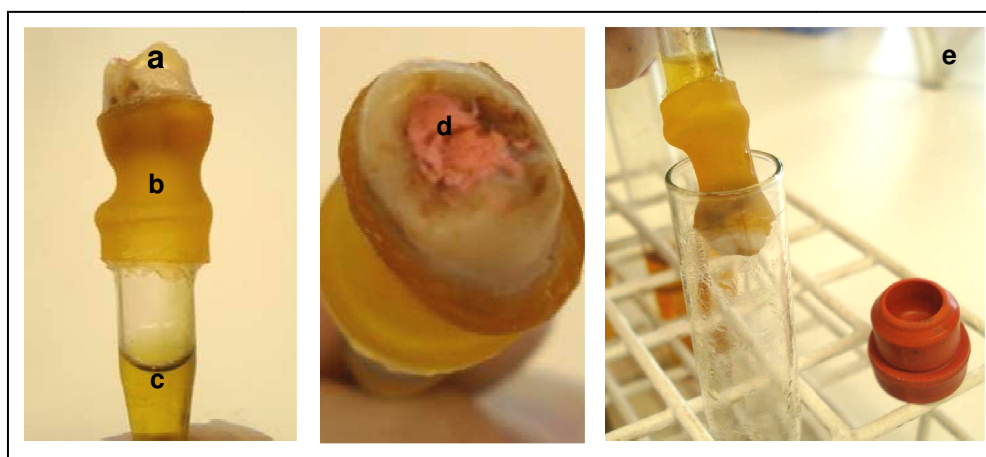
##### **4.4.3.1 Modelo “*in vitro*”**

Para a avaliação da ação antimicrobiana do extrato bruto de *S. terenbenthifolius* Raddi *in vitro* foi realizada uma adaptação de modelo experimental de infecção “*in vitro*” estabelecido por CARVALHO et al. (2003). O modelo consiste de um sistema fechado, contendo uma coroa dental seccionada da raiz com uma abertura realizada de forma artificial, acoplada por uma estrutura

de borracha a um microtubo (volume de 1mL), tipo “Eppendorf”, exposta de maneira variável a um meio de cultura líquido dentro de um tubo de ensaio.

Para a montagem do modelo, as coroas foram seccionadas 1 mm abaixo da união cimento-esmalte visando a separação da raiz. Na superfície oclusal do dente foi realizada a abertura coronária. As coroas obtidas foram adaptadas pela região cervical por meio de uma cinta de borracha com 8 mm de diâmetro, 8 mm de altura e 1 mm espessura ao microtubo com a tampa removida. As interfaces resultantes das uniões foram vedadas com o auxílio de uma cola a base de silicone. Após a finalização do conjunto (tubo tipo “Eppendorf” com anel de borracha e coroa dental, Figuras 3a e 3b) acrescentou-se 200 µL de meio líquido caldo simples esterilizado no interior do tubo tipo “Eppendorf” (Figura 3c). Em seguida foi realizado o selamento da abertura coronária com guta-percha permitindo assim a infiltração lenta das bactérias de fora para dentro e vice versa (Figura 3d), o conjunto foi imerso em meio esterilizado em um tubo de ensaio de 1,5 cm de diâmetro por 10 cm de comprimento e fechado (Figura 3e).

FIGURA 3 - VISTA DA MONTAGEM DO MODELO EXPERIMENTAL ADAPTADO PARA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE *S. terebenthifolius* Raddi



Legenda: **a** coroa dental; **b** anel de borracha; **c** meio interno; **d** guta percha (abertura coronal); **e** imagem do sistema de cultivo realizado no tubo de ensaio contendo o meio externo.

#### 4.4.3.2 Avaliação da ação antimicrobiana de *S. terebenthifolius* Raddi

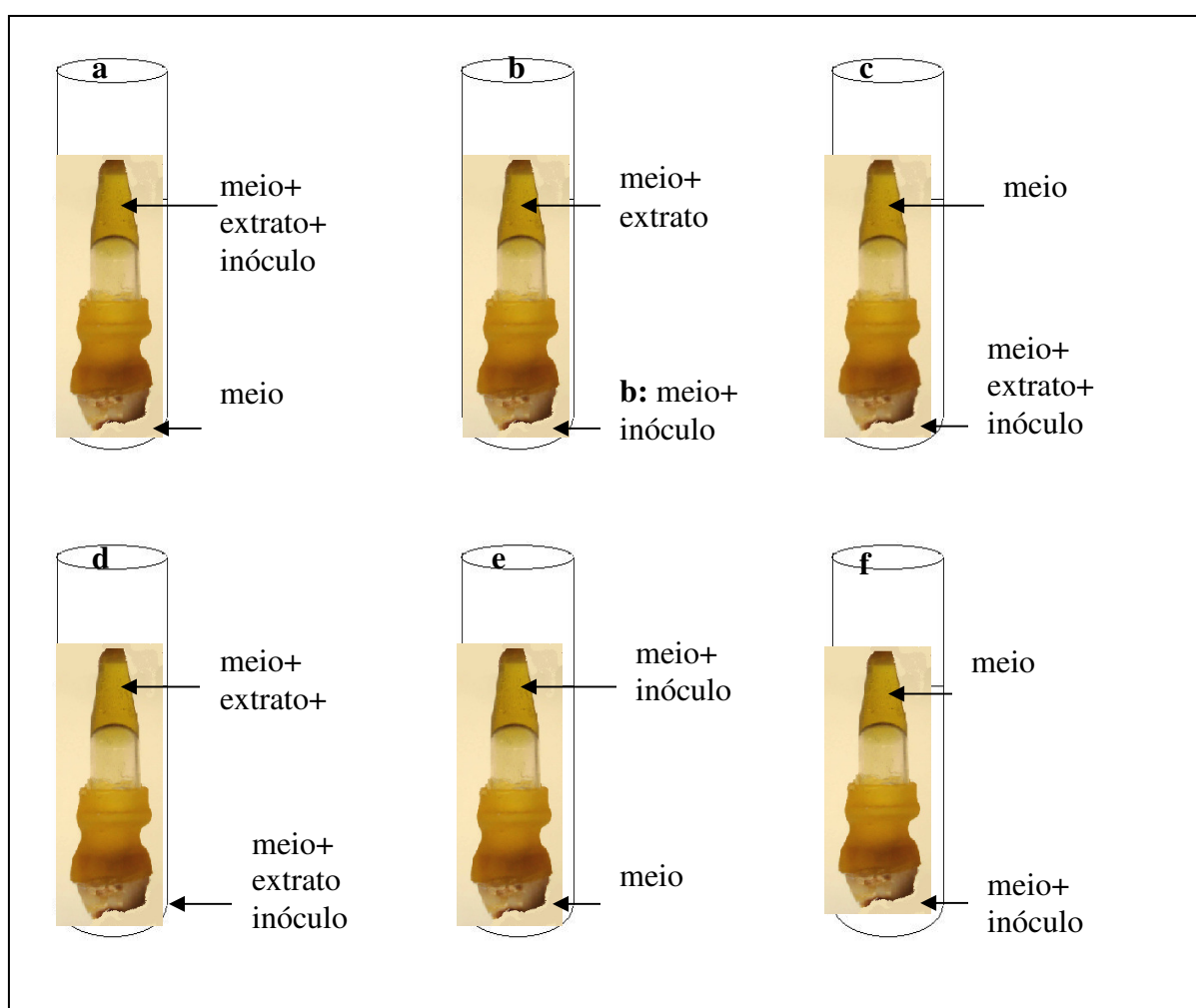
Para a realização dos testes de avaliação da ação antimicrobiana do extrato foram utilizados, para cada cultura, quatro dentes humanos pré-molares extraídos por indicação ortodôntica. Para cada dente montado foram testadas variações da utilização do substrato, assemelhando-se nas formas de uso das substâncias normalmente utilizadas na Odontologia. Para este experimento foi utilizado apenas o substrato extraído de folhas obtidas das plantas coletadas em 2002.

Sendo assim, para cada cultura bacteriana avaliada foram testadas quatro adaptações do modelo (Figura 4):

- Modelo (1) – utilizou-se acrescido ao meio interno em contato com o dente (dentro do microtubo), a dose inibitória máxima do extrato bruto estabelecida para cultura mais o inóculo. Totalizando um volume de 400  $\mu$ L contendo 200  $\mu$ L do meio de cultura acrescido do extrato e 200 $\mu$ L do inóculo. No tubo de ensaio foi acrescentado 5 mL de meio esterilizado sem inóculo e substrato.
- Modelo (2) - onde foi utilizado dentro do microtubo, um volume de 400 $\mu$ L de meio esterilizado acrescido da dose inibitória máxima do extrato sem inóculo. Externamente, dentro do tubo de ensaio, utilizou-se 2,5 mL de meio esterilizado acrescido de 2,5 mL de inóculo.
- Modelo (3) – acrescentou-se dentro do microtubo um volume de 400  $\mu$ L do meio esterilizado sem inóculo e no tubo de ensaio ( meio externo) 2,5 mL de meio esterilizado com a dose inibitória mínima do extrato mais 2,5 mL de inóculo.
- Modelo (4) - apresentava dentro do microtubo um volume de 400  $\mu$ L (contendo 200  $\mu$ L do meio de cultura acrescido da dose inibitória máxima do substrato) e no meio externo foi acrescentado a dose inibitória máxima do substrato com 2,5 mL do inóculo, totalizando 5 mL.
- Modelos controles - contendo 200 $\mu$ L do meio esterilizado mais 200 $\mu$ L do inóculo no microtubo e externamente apenas o meio sem inóculo e vice-versa.

Em seguida, após o cultivo em aerobiose a 37° C por 48 horas, alíquotas de 15 µL das amostras internas e externas dos meios foram diluídas ( $10^3$ ) e semeadas em meio ágar simples e incubados em aerobiose a 37° C, por 24 horas. A avaliação do crescimento era realizada por meio da visualização das colônias e estimativa das UFC/mL.

FIGURA 4 - VARIAÇÃO DA FORMA DE APLICAÇÃO DO SUBSTRATO EM RELAÇÃO AO INÓCULO DENTRO DO MODELO EXPERIMENTAL TESTADO



Legenda: Modelo experimental 1 (a) meio interno com extrato+meio+inóculo e meio externo sem inóculo; modelo experimental 2 (b) meio interno com extrato sem inóculo e meio externo com inóculo; modelo experimental 3 (c) meio interno sem inóculo e meio externo com extrato+meio+inóculo; modelo experimental 4 (d) meio interno com extrato+meio e meio externo com extrato+inóculo; modelo controle 1 (e) meio interno com inóculo e meio externo; modelo controle 2 (f) meio interno e meio externo com inóculo



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO

A partir do isolamento realizado em dentes com polpas necrosadas de 17 pacientes atendidos nos Prontos Atendimentos Odontológicos da UFPR e PUC-PR, verificou-se a presença de culturas positivas em 12 pacientes 70% obtendo-se uma contagem em torno de  $10^7$  células por/mL de meio cultivado, tanto para culturas aeróbicas, quanto para as anaeróbicas. Entre as amostras analisadas, foram recuperados isolados somente na cultura aeróbica, onde em um paciente (6%) obteve-se um isolado de cocos Gram-positivo identificado de acordo com a morfologia como *Staphylococcus* sp e 01 amostra de bacilo Gram-negativo. Em 07 dentes (46%) foram isoladas bactérias cocos Gram-positivas, identificados como *Staphylococcus* sp, porém apenas três amostras apresentaram-se viáveis nas provas bioquímicas e os isolados foram identificados como *Staphylococcus* coagulase positiva. Para quatro dentes (26%) obtiveram-se colônias morfologicamente caracterizadas como bacilos Gram-negativos, bioquimicamente identificadas como *Pseudomonas* sp. Somente em um dos dentes analisados foi recuperado um bacilo Gram positivo (6%) não identificado bioquimicamente.

Tais resultados vêm de encontro com os dados já relatados indicando que os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* estão em evidência entre os que determinam e mantêm infecções endodônticas (ANDO e HOSHINO, 1990; KHEMALEELAKUL, BAUMGARTNER e PRUKSAKORN, 2002; PETERS, WESSELINK e van WINKELHOFF, 2002).

Sendo de acordo com a literatura, existe uma grande variação de bactérias isoladas dos canais endodônticos, entre os diferentes gêneros destacam-se isolados de *Prevotella*, *Porphyromona*, *Treponema*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Veionella* e *Peptostreptococcus* (ANDO e HOSHINO, 1990; ALBUQUERQUE, DINIZ E MATHEUS, 1999; KHEMALEELAKUL, 2002; PETERS; WESSELINK e WINKELHOFF, 2002) e freqüentemente a percentagem

de recuperação de bactérias anaeróbicas tem sido muito maior do que a relatada neste trabalho. Tal fato pode ser justificado pelo método de microaerofilia adotado e principalmente pelas técnicas de conservação, onde a maioria das amostras isoladas se tornou inviável em curto espaço de tempo. Métodos de preservação específicos utilizando técnicas de resfriamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  em óleo mineral são de extrema importância para a manutenção dessas culturas (MOREIRA, 2006).

Khemaleelakul (2002) trabalhando com secreções purulentas de abscessos de infecção periapical, relatou que a identificação da maior parte dos isolados anaeróbicos só foi possível por meio de marcadores moleculares, onde o autor utilizou *primers* específicos para as espécies *Bacterioides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Veionella*, *Propionibacterium* e acrescentou que pelos métodos clássicos de identificação só era possível verificar grupos bacterianos facultativos como *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* e os resultados encontrados revelaram que as espécies *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* eram predominantes.

Da mesma forma, Siqueira *et al.* (2002a) discutiram em seu trabalho que o isolamento das bactérias anaeróbicas presentes em canais radiculares era de difícil resultado, devido ao alto grau de sensibilidade destas bactérias ao oxigênio. Como nas jarras de anaerobiose se utiliza apenas pastilhas de compostos químicos como gerador de atmosfera anaeróbica, as quais são limitadas na geração desta atmosfera, as bactérias anaeróbicas tornam-se inviáveis pelo grande período de transição atmosférica. Justificando assim os baixos índices de recuperação nestas formas de cultivo, comparado com os números de aproximadamente 90% de bactérias anaeróbicas, isoladas a partir de abscesso endodôntico, utilizando estufas alimentadas com  $\text{CO}_2$  na geração da atmosfera anaeróbica (RÔÇAS *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2002a).

Para Hashioka *et al.* (1992) e Hashioka *et al.* (1994) nenhuma espécie bacteriana específica pode ser responsável pelas doenças pulpares e periapicais. Entre as bactérias causadoras desta infecção (etiologicamente associadas com a severidade e sintomatologia) a maioria é anaeróbica Gram-negativa. Apesar de mais de 50 espécies bacterianas não serem associadas a nenhum quadro clínico

específico, a presença de espécies anaeróbicas restritas é diretamente correlacionada a alguns sintomas e sinais. As infecções anaeróbicas usualmente produzem necrose tecidual com formação de abscesso. Clinicamente, o paciente desenvolve edema, com dor e febre. *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis* e *Peptostreptococcus* podem ser os responsáveis por doenças subagudas; *Eubacterium* e *Prevotella buccae*, por doenças crônicas. De acordo com Brook; Grazier e Gher (1991), Drucker e Lilley (1997) as espécies de anaeróbios são frequentemente isoladas de canais radiculares sintomáticos numa porcentagem de 70 a 90%.

## 5.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

A partir de 651,87g de folhas e 185,58g de talos, obtidos durante as coletas realizadas no ano de 2005, (região de Guaraqueçaba, litoral do Estado do Paraná), priorizou-se a padronização da utilização dos extratos de folhas, uma vez que estes apresentaram a maior quantidade disponível em peso e consequentemente maior rendimento (TABELA 2).

TABELA 2 - RENDIMENTO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

<b>Amostra</b>	<b>Peso</b>	<b>Rendimento</b>
Folhas	651,87g	
Talos	185,58g	
Extrato Hexânico Folhas	13,899g	2,28%
Extrato Hexânico Cabinhos	4,6562g	3,05%
Extrato Metanólico Folhas*	104,613g	16,20%
Extrato Metanólico Cabinhos	13g	7,54%

\* Amostra não totalmente seca

No fracionamento do extrato metanólico das folhas foram obtidas 11 frações, as quais estão apresentadas na Tabela 3 com seus respectivos pesos.

Para as amostras de folhas coletadas no ano de 2005 foi extraído o extrato bruto e então realizado o fracionamento (TABELA 3).

TABELA 3 - FRACIONAMENTO REALIZADO A PARTIR DO EXTRATO SECO DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi COLETADA NO ANO DE 2005

Amostras (numero)	Fração	Peso (g)
1	Éter de Petróleo	0,0108
2	Éter de Petróleo: Diclorometano (1:1)	0,0763
3	Diclorometano – I	0,0108
4	Diclorometano – II	0,0576
5	Diclorometano: Acetato de Etila (1:1)	0,2470
6	Acetato de Etila – I	0,3391
7	Acetato de Etila – II	0,2369
8	Acetato de Etila:Metanol (1:1)*	16,1402
9	Metanol – I**	
9b	Metanol em água – I**	
10	Metanol – II **	
10b	Metanol em água – II**	
11	Metanol final	0,1094

\* amostra não completamente seca

\*\* amostras que sofreram contaminação por fungos

O mesmo fracionamento foi realizado a partir do extrato seco obtido no ano de 2002, onde o extrato recebido encontrava-se em solução hidroalcoólica e foi concentrado por meio de secagem em evaporador rotativo a vácuo à temperatura de 40 °C durante o período de 50 min. e os resultados sumarizados na Tabela 3, indicam rendimentos menores justificados devido ao tipo de manipulação da amostra.

TABELA 4 - FRACIONAMENTO REALIZADO A PARTIR DO EXTRATO SECO DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi COLETADA NO ANO DE 2002

Amostras (numero)	Fração	Peso (g)
1	Éter de Petróleo	0,078
2	Diclorometano – I	0,090
3	Acetato de Etila – I	0,340
4	Acetato de Etila:Metanol (1:1)	0,480
5	Metanol	0,420

### 5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE “IN VITRO” FRENTE AO EXTRATO DE AROEIRA

A partir dos testes de concentração inibitória mínima do extrato bruto hidroalcoólico 80% de folhas coletadas em 2002, verificou-se ausência de crescimento nas concentrações de 650 µg/mL para as linhagens referências de *E.coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e para o isolado de *Pseudomonas*. Para as linhagens Gram-positivas, tanto referencia quanto o isolado de identificado como *Staphylococcus* sp verificou-se uma concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 200 µg/mL. Na Tabela 5 estão sumarizados os resultados encontrados de acordo com as concentrações testadas.

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO SÓLIDO (BHI-S) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius Raddi*, OBTIDAS DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	-	-	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>5</sup> ufc	10 <sup>2</sup> ufc	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>5</sup> ufc	10 <sup>3</sup> ufc	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas</i> sp	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>5</sup> ufc	10 <sup>2</sup> ufc	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus</i> sp Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	-	-	-	-	-	-	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias/por mL de meio cultivado

Observando as concentrações inibitórias mínimas sumarizadas na Tabela 5, verificou-se que o extrato bruto hidroalcoólico (data de coleta, 2002) apresentava inibições próximas às anteriormente relatadas por diversos autores (MARTINEZ, GONZÁLEZ e BADELL, 1996; GUERRA et al., 2000; MELO et al., 2002; LIMA et al., 2004) em que as bactérias Gram-positivas como *S. aureus*,

*Staphylococcus* coagulase negativa e *Lactobacillus* apresentavam inibição de crescimento a partir da concentração de 200 µg/mL, enquanto que a *P. aeruginosa* era inibida em concentrações acima de 650µg/mL.

Na avaliação da ação antimicrobiana do substrato bruto (solução hidroalcoólica 80%, 2002) em meio líquido, verificou-se uma variação do potencial em relação às linhagens utilizadas. De acordo com a Tabela 6 observou-se um aumento da concentração inibitória mínima para as linhagens referências e isolados Gram-negativos, como a *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e o isolado de *Pseudomonas* que apresentavam ausência de crescimento nas concentrações acima de 850 µg/mL. Uma concentração inibitória mínima (CIM) menor (200 µg/mL) foi verificada para as linhagens Gram-positivas, tanto referência quanto o isolado identificado como *Staphylococcus sp.*

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi PARA DIFERENTES CULTURAS EM MEIO LÍQUIDO (BHI-S). ANO DE COLETA 2002

Concentração µg/mL	0	200	450	650	850	1000	1500
<b>Linhagens</b>							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	1x10 <sup>7</sup> ufc	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1x10 <sup>7</sup> ufc	7x10 <sup>6</sup> ufc	5x10 <sup>4</sup> ufc	1x10 <sup>2</sup> ufc	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	1x10 <sup>7</sup> ufc	1x10 <sup>7</sup> ufc	1x10 <sup>6</sup> ufc	1x10 <sup>3</sup> ufc	2x10 <sup>2</sup> ufc	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>	1x10 <sup>7</sup> ufc	2x10 <sup>6</sup> ufc	2x10 <sup>4</sup> ufc	3x10 <sup>2</sup> ufc	-	-	-
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	1x10 <sup>7</sup> ufc	-	-	-	-	-	-

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias/ por mL de meio cultivado.

De acordo com a literatura (MARTINEZ; GONZÁLEZ e BADELL, 1996; GUERRA et al., 2000; MELO et al., 2002 e LIMA et al., 2004) os testes de avaliação da atividade antimicrobiana freqüentemente vêm sendo realizados em meio sólido ao contrario do presente trabalho que também avaliou a inibição em

meio líquido, onde os resultados revelaram uma diferença nos níveis de concentração necessários para a total inibição das bactérias.

O aumento dos valores da concentração inibitória mínima para as linhagens e isolados testados frente ao substrato em meio líquido pode ser melhor visualizado graficamente (Figura 5). Tal achado pode ser justificado devido ao fato da cultura em meio líquido propiciar maior exposição aos substratos para as células presentes no meio e conseqüentemente promover um enriquecimento do crescimento (KONEMANN, 2001). Além disso, o meio líquido devido a sua natureza, gera do ponto de vista físico, uma aerofilia parcial o que favorece o crescimento das bactérias metabolicamente classificadas como anaeróbicas facultativas, como no caso daquelas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e as espécies *E. coli*, utilizadas como referencia neste trabalho. Sendo assim, o aumento no número de células viáveis pode ter sido a causa da elevação da concentração do produto para o controle do crescimento.

A avaliação das frações do substrato bruto (obtido das plantas coletas em 2002) indicou que as referidas frações não apresentavam ação antimicrobiana separadamente. Os resultados do crescimento das culturas (linhagens referencias e isolados) testadas frente a diferentes concentrações do extrato fracionado em éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol estão sumarizadas nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 do Anexo 1.

A partir destes resultados foi realizada a avaliação do crescimento das culturas em meio líquido contendo uma combinação de associação das diferentes frações (Tabela 6, do Anexo 1). Onde foi observado que a inibição ocorreu para a maioria das culturas testadas na associação entre as frações obtidas em acetato mais a de metanol, na concentração inibitória mínima de 700 µg/mL (Tabela 7) indicando que o principio ativo antimicrobiano pode ser obtido a partir da associação destas amostras. Porém, a linhagem referencia de *E. coli* apresentou crescimento na concentração testada e uma avaliação do crescimento frente concentrações maiores desta associação deveria ser realizada.

Para se determinar à fração responsável pela ação antimicrobiana foram buscados na literatura um parâmetro, porém nos trabalhos foram encontradas apenas sugestões mencionando a necessidade de investigar a possível fração

responsável pelo princípio ativo (KAISTHAN e KIER, 1962; CAMPELLO e MARSAIOLI, 1975; AMORIM e SANTOS, 2003; LIMA et al., 2004) onde não foi verificado nenhum relato a respeito de testes envolvendo o princípio responsável pelas diferentes atividades do composto fracionado ou a identificação da fração responsável pela ação antimicrobiana.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DAS FRAÇÕES ASSOCIADAS (ACETATO E METANOL) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Concentração $\mu\text{g/mL}$							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7$ ufc	$10^4$ ufc	$10^3$ ufc	$10^1$ ufc				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7$ ufc	$10^6$ ufc	$10^4$ ufc	$10^3$ ufc	$10^2$ ufc			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^6$ ufc	$10^6$ ufc	$10^5$ ufc	$10^5$ ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^5$ ufc	$10^3$ ufc	$10^2$ ufc			
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7$ ufc	$10^3$ ufc	$10^2$ ufc	$10^1$ ufc				

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

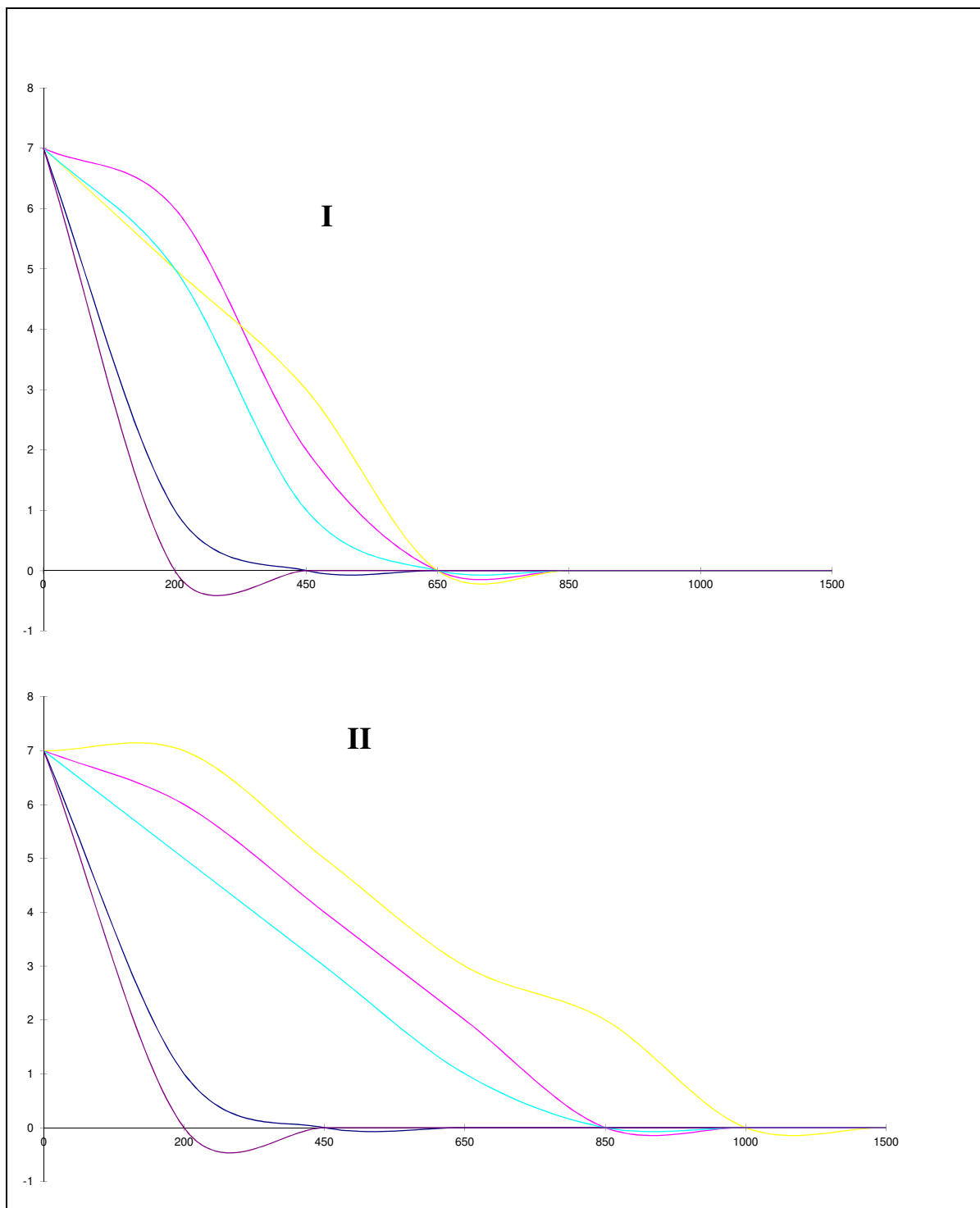
Os mesmos critérios de avaliação da ação antimicrobiana adotados para o extrato obtido das plantas coletadas no ano de 2002, foram estabelecidos para o fracionamento do extrato bruto de 2005, com o objetivo de avaliar o potencial da planta coletada em épocas diferentes.

De acordo com os resultados obtidos para o extrato bruto fracionado, nenhuma das frações apresentou potencial de inibição bacteriana isoladamente nas diferentes concentrações testadas (Tabelas de 1 a 6, Anexo 2). Durante estes experimentos foi adotado como controle o meio contendo etanol a 80%, onde foi verificado crescimento em todas as culturas, demonstrando assim que o álcool a 80% não promove inibição do crescimento para estas culturas. O mesmo resultado foi verificado para as frações do extrato bruto obtido das plantas coletadas em 2002, onde somente as combinações das frações metanol mais acetato



apresentaram potencial bactericida (Tabela 6 do Anexo 2).

FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, (ANO DE COLETA, 2002) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO: MEIO SÓLIDO (I) E MEIO LÍQUIDO (II)



Legenda: Concentração Inibitória Mínima (CIM) nos meios de cultivo sólido (I) e líquido (II) para as diferentes culturas bacterianas testadas (representadas por diferentes cores: azul, *Staphylococcus aureus* ATCC 27213; rosa, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; amarelo, *Escherichia coli* ATCC 35219; azul claro *Pseudomonas sp* e roxo, *Staphylococcus coagulase* negativo)

Tecnicamente o álcool pode ser utilizado na remoção de excessos de cimentos endodônticos (COHEN e BURNS, 2000; LEONARDO e LEAL, 1995; ESTRELA, 2004) e em preparações laboratoriais, como técnicas histológicas para estudos da estrutura dental e ou na união dentina e materiais restauradores para microscopia (ESBERARD et al., 2004 e CASELLATTO et al., 2004). Porém, sabe-se que dependendo do teor alcoólico da solução associado ao tempo de exposição à estrutura do dente, isto pode gerar efeitos adversos relacionados à retirada da água presente no tecido dentinário (desidratação). Como este é o principal tecido do interior da raiz dental, tal alteração pode tornar o dente friável.

Sendo assim, no presente trabalho foi avaliado a redução do alto teor de álcool na solução hidroalcoólica base (80%) utilizada na preparação dos substratos (bruto e fracionado). A maioria dos autores tem utilizado a solução base a 80% (GUERRA et al., 2000; MELO et al., 2002 e LIMA et al., 2004). No entanto, de acordo com a literatura existem trabalhos utilizando o extrato hidroalcoólico a 30% (MARTINEZ; GONZÁLEZ e BADELL 1996).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, utilizando o extrato bruto e fracionado em solução hidroalcoólica a 30%, verificou-se a ausência de inibição do crescimento das culturas para os extratos fracionados obtidos das plantas coletadas no ano de 2002 e 2005 (Tabelas 1 a 10 do Anexo 3). Porém, utilizando o extrato bruto (2002) e as frações associadas (2002 e 2005) verificou-se, de acordo com as UFC/mL, uma redução parcial do crescimento (Tabela 6 Anexo 3), indicando assim, o efeito da potencialização do princípio ativo antimicrobiano da aroeira pelo álcool .

Martinez; González e Badell (1996) utilizaram substratos brutos em solução hidroalcoólica de etanol a 30% e os resultados indicavam a inibição do crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Independentemente da concentração do substrato na solução (100 e 50%). Porém nestas condições não foi observado o controle para leveduras *C. albicans*.

No entanto, Guerra *et al.* (2000) encontraram atividade antimicrobiana para *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* utilizando extrato hidroalcoólico de folhas (concentrações de 80% até 1%) em 80% de etanol,

relatando que na concentração a 1% do substrato a maior inibição ocorria para as culturas de *S. aureus*. Melo *et al.* (2002) e Lima *et al.* (2004), utilizando substrato a 80%, tiveram resultados significativos de inibição frente às bactérias Gram-positivas frente a baixas concentrações de substrato, porém para as Gram-negativas a inibição ocorria em concentrações mais elevadas. Leal *et al.* (1996) de forma similar também obteve inibições de bactérias do gênero *Staphylococcus* com o uso do extrato em gel de *S. terebenthifolius* e acrescentaram que o extrato aquoso apresentava atividade inibitória frente a fungos filamentos tais com *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *E. floccosum* e *C. albicans* segundo estudo de IEVEN *et al.* (1979).

De acordo com a literatura (CARLSON, DOUGLAS e ROBERTSON, 1948; MALCOLM e SOFOWORA, 1969; IEVEN *et al.*, 1979; LEAL *et al.*, 1996; RUIZ *et al.*, 1996) relataram que fungos oportunistas como os do gênero *Candida* e *Aspergillus* apresentaram resistência frente ao extrato.

Sendo assim novas diluições alcoólicas deverão ser testadas, visando obter uma redução no teor de álcool da solução, sem diminuir o potencial antimicrobiano dos extratos, uma vez que existe uma diversidade de trabalhos relacionados com resultados variados em relação ao teor de metanol.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO UTILIZANDO UM MODELO “*IN VITRO*” DE INFECÇÃO ENDODÔNTICA

Baseados nos resultados obtidos e apresentados a partir dos testes de sensibilidade antimicrobiana “*in vitro*” com os extratos brutos e frações das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi, buscou-se a adaptação do modelo experimental de pesquisa em infiltrações marginais de materiais restauradores em odontologia para pesquisa de medicações de “demora”<sup>5</sup>, visando a padronização da avaliação da ação antimicrobiana do substrato como uso intracanal.

A adaptação visou testar a medicação na situação mais próxima da realidade encontrada nos casos de tratamento endodôntico envolvendo

---

<sup>5</sup>Medicações intracanaís que permanecem no dente fechadas com restaurações provisórias no período entre sessões para aumentar o combate às bactérias e/ou desinflamar o remanescente pulpar.

medicação de demora exposta a restaurações que tenham uma infiltração indesejada, ocasionando uma infecção secundária.

Avaliando a infiltração ocorrida no modelo utilizado, e considerando as diferentes variações, verificou-se para os modelos controles, a contaminação do meio externo quando o inóculo era realizado no meio interno (controle 1, Figura 4e).

Da mesma forma quando o inóculo era realizado no meio externo ocorria à contaminação do meio interno (controle 2, Figura 4f), comprovando assim a existência da infiltração através do selamento na superfície oclusal da coroa dental utilizada no modelo.

Tais resultados indicaram que o selamento não impedia a circulação de bactérias entre os meios interno e externo, demonstrando a adequação do modelo para avaliar o potencial antimicrobiano deste substrato em situação de infiltração.

Sendo assim, a ação do substrato foi testada frente a várias situações dentro do modelo.

Quando o substrato era acrescentado ao meio interno inoculado com as diferentes culturas testadas, verificou-se que havia contaminação no meio externo. Porém ocorria uma redução no número de células inicialmente inoculados de  $10^7$  UFC/mL para  $10^3$  UFC/mL nos inóculos realizados com as bactérias Gram-positivas e de  $10^5$  UFC/mL para os inóculos contendo as culturas Gram-negativas.

Avaliando a situação inversa onde no meio interno havia apenas o meio de cultura e o meio externo contendo o inóculo e a presença do substrato, verificou-se que o meio interno apresentava a colonização, porém com uma diminuição no número de células em torno de  $10^2$  UFC/mL para bactérias Gram-positivas e de  $10^6$  UFC/mL para bactérias Gram-negativas.

Da mesma forma a presença do substrato no meio interno não impedia a penetração das bactérias inoculadas no meio externo. No entanto, verificou-se uma redução das bactérias inicialmente inoculadas no meio externo, tanto para as culturas Gram-positivas ( $10^2$  UFC/mL) e em torno de  $10^5$  UFC/mL para as bactérias Gram-negativas.

Hipoteticamente esta simulação seria a mais próxima do procedimento terapêutico endodôntico. Uma vez que durante este procedimento, a região infeccionada freqüentemente é removida, gerando a retirada do material produtivo resultante da infecção. Nesta etapa uma medicação intracanal é realizada e após o selamento da região, o dente permanece em contato com meio externo que apresenta uma microflora extremamente variada e ricamente elevada ( $10^{11}$  UFC/mL de saliva cultivada).

Diante do resultado observado pode-se sugerir o potencial do uso deste substrato como medicação intracanal. Porém, o selamento deve ser o mais hermético possível e o tempo do curativo reduzido, evitando assim a ocorrência da infiltração.

Com o objetivo de explorar o potencial antimicrobiano do substrato uma nova situação foi simulada onde o meio interno continha o substrato na concentração inibitória máxima e ao meio externo também foi adicionado além do substrato o inóculo ( $10^7$  UFC/mL). Nesta situação observou-se a redução total no número de unidades formadoras de colônias após o cultivo dos meios internos e externos. Tais resultados indicaram que o potencial bactericida do substrato aumenta de acordo com a concentração e a relação volume a volume, demonstrando que diferentes culturas bacterianas poderiam ser inibidas na presença deste, porém novos testes de concentração e proporção de v/v nestas condições deveriam ser realizados.

De acordo com a literatura, para haver uma melhor eficiência da medicação intracanal e evitar uma infecção secundária, a medicação e a restauração provisória deve ser capaz de impedir e neutralizar a invasão microbiana originária da boca (periodonto, saliva e mucosa), através dos materiais restauradores provisórios favorecendo a ação antimicrobiana “máxima” da medicação (JORGE, 1995; LOPES et al., 2004; COHEN et al., 2000; ALBUQUERQUE et al., 1999; OLIVEIRA, 1999; DE DEUS et al., 1992; ESTRELA et al., 1994; De UZEDA et al., 2002; LEONARDO, et al. 2005).

No experimento proposto foi observado que o extrato é capaz de controlar o crescimento bacteriano no interior dental mesmo que este esteja com infiltração marginal no restaurador provisório, mas sua ação é efetiva no combate a

contaminação bacteriana se simultaneamente o material restaurador provisório for efetivo no vedamento marginal.

Como sendo o modelo apresentado uma adaptação, sugere-se a comparação e experimentação das medicações endodônticas de ação já conhecida para se confrontar com os resultados obtidos com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi e confirmar a possível efetividade do modelo nas pesquisas futuras.

## 6 CONCLUSÃO

Das plantas selecionadas foram obtidos os extratos brutos hidroalcoólicos e destes extratos levados para coluna a vácuo resultou-se de 13 frações da amostra coletado no ano de 2005 e da amostra coletada de 2002 observou-se 5 frações.

De acordo com as condições testadas, o extrato bruto apresentou uma atividade maior frente às bactérias Gram-positivas em comparação as Gram-negativas que necessitam de maior concentração para sua inibição e principalmente em meios líquidos.

O estudo do potencial antimicrobiano do extrato bruto fracionado revelou que as frações isoladamente não apresentaram ações antimicrobianas de maneira isolada, mas quando associadas as frações obtidas em metanol com acetato são as responsáveis pelo princípio ativo do extrato hidroalcoólico.

O álcool apresentado como solvente dos extratos possui a capacidade de potencializar a ação antimicrobiana dos princípios ativos do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. terenbenthifolius* Raddi.

A utilização do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. terenbenthifolius* Raddi como medicação intracanal em endodontia apresentou dados favoráveis para se prosseguir com as pesquisas de suas propriedades no campo odontológico.

## REFERÊNCIAS

AAE – Lasers in Dentistry. **Position statement on the use of lasers in dentistry.** Disponível em: <<http://www.aae.org.lasers.html>>. Acesso em: 26 jun. 2003

ALBUQUERQUE, D. S.; DINIZ, A. S.; MATHEUS, T. C. U. Considerações clínicas sobre a microbiota endodôntica. **Rev. Cons. Reg. Odontol. Pernamb.**, v.2, n.2, p.102-107, 1999.

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebenthifolius Raddi*): Ensaio clínico randomizado. **RBGO. Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.25, n.2, p.95-102, 2003.

ANDO, N.; HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. **Int. Endod. J.**, v.23, n.1, p.20-27, 1990.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **J. Ethnopharm.**, v.39, p.119-128, 1993.

BALBACHAS, A. **As Plantas Curam.** São Paulo: A missionária “A verdade presente”, 1960.

BAUNGARTNER, J. C., FALKLER, W. A. Bacteria in the apical 5mm on infected root canals. **J. Endod.**, v.17, n.8, p.380-383, 1991.

BERGER, C. R. **Endodontia Clínica.** São Paulo: Pancast Editora, 2002.

BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECHKO, N. G. AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebenthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cir. Brás. Suppl.**, v.2, p.15-20, 2006. Disponível em <http://scielo.br/acb>. Acesso em 5/12/2006.

BROOK, I.; FRAZIER, E. H.; GHER, M. E. Aerobic e anaerobic microbiology el periapical abscess. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.6, p.123-25, 1991.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Editora Argos, 2001.

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J. Terebenthifoc acid and bauerenone: new triterpenoid ketones from *Schinus terebenthifolius*. **Phytochemistry**, v.14, p.2300-2302, 1975.

CARLSON, H. J.; DOUGLAS, H. G.; ROBERTSON, J. Antibacterial substances separated from plants. **Am Soc Microbiol.**, v.55, p.241-248, 1947.



CARVALHO, G. L.; HABITANTE, S. M.; JORGE, A. O. C.; MARQUES, J. L. L. Cimentos provisórios utilizados no selamento entre sessões do tratamento endodôntico: estudo microbiológico. **J. Bras. Endod.**

[http://portal.revistas.bvs.br/transf.php?xsl=xsl/titles.xsl&xml=http://catserver.bireme.br/cgi-bin/wxis1660.exe/?IsisScript=../cgi-bin/catrevistas/catrevistas.xisl/database\\_name=TITLESlist\\_type=titlecat\\_name=ALLlfrom=1lcount=50&lang=pt&comefrom=home&home=false&task=show\\_magazines&request\\_made\\_adv\\_search=false&lang=pt&show\\_adv\\_search=false&help\\_file=/help\\_pt.htm&connector=ET&search\\_exp=JBE%20j.%20bras.%20endodontia](http://portal.revistas.bvs.br/transf.php?xsl=xsl/titles.xsl&xml=http://catserver.bireme.br/cgi-bin/wxis1660.exe/?IsisScript=../cgi-bin/catrevistas/catrevistas.xisl/database_name=TITLESlist_type=titlecat_name=ALLlfrom=1lcount=50&lang=pt&comefrom=home&home=false&task=show_magazines&request_made_adv_search=false&lang=pt&show_adv_search=false&help_file=/help_pt.htm&connector=ET&search_exp=JBE%20j.%20bras.%20endodontia), v.4, n.15, p.297-300, 2003.

CASELLATTO, C.; BAGGIO, D. P.; WANDERLEY, M. T.; RODRIGUES, C. R. M. D. Efeito de diferentes métodos de descontaminação na resistência adesiva de um compósito à dentina de dentes decíduos. **Braz. Oral Res.**, v.18 (Supplement of the 21<sup>nd</sup> Annual SBPqO Meeting), 2004.

COHEN, S.; BURNS, R. C. **Caminhos da Polpa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

CORRÊA, M. P.. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

DANIEL, R. L. D. P.; JAEGER, M. M. M.; MACHADO, M. E. L. Emprego do iodofórmio em endodontia – revisão da literatura. **RPG Rev. Pós Grad.**, v.6, n.2, p.175-179, 1999.

DE DEUS, Q. D. **Endodontia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

DIKSHIT, A.; NAQUI, A. A.; HUSAIN, A., *Schinus molle*: a New Source of Natural Fungitoxicant. **Appl. Evirom. Microbiol.**, v.51, n.5, p.1085-1088; 1999.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medical plants. **J. Ethnopharm.**, v.97, p.305-311, 2005.

EDUARDO, C. de P.; GOUW-SOARES, S. The use of lasers for endodontic applications in dentistry. **Medic Laser Applic.**, v.16, n.3, p.231, 2001.

ESBERARD, R. R.; CONSOLARO, A.; ESBERARD, R. M.; BONETTI FILHO, I.; ESBERARD, R. R. **Rev. Dental Press Estet.**, v.1, n.1, p.58-72, 2004.

ESTRELA, C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BAMMANN, L. L.; FELIPPE, O. JR. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbicas. **Rev. Fac. Odont. Bauru**, v.2, n.4, p.31-38, 1994.

FARBER, P. A.; SELTZER, S. Endodontic Microbiology. I. Etiology. **J. Endod.**, v.14, n.7, p.363-371, 1988.

FEGAN, S. E.; STEIMAN, H. R. Comparative evaluation on the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation: an in vitro study. **J. Endod.**, v.21, n.8, p.415-417, Aug. 1995.

FERREIRA, B. Fitoterapia: plante essa idéia. **Rev. ABO Nac.**, v.4, p.4-6, 1996.

FLEIG, M. *Anacardiáceas*. In: REITZ, P. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: IOESC, 1989.

GOMES, B. P.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Association of specific bacteria with some endodontic sings and sympotons. **Int. Endod. J.**, v.27, p.291-98, 1994.

GOMES, V. B. **Atividade antimicrobiana da Radiação Laser Nd:YAG, frente a anaeróbicos do sistema de canais radiculares**: estudo *in vitro*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 2003.

GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebenthifolius Raddi* (copal). **Rev. Cubana Plant. Med.**, v.5, n.1, p.23-25, 2000.

HAAPASALO, M. **The genus Bacteroides in human dental root canal infections**. Academic dissertation – University of Helsinki, Finland, 87, 1986.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**, 3<sup>a</sup> ed. London: Chapman & Hall, 1998.

HARDEE, M. W. et al. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. **J Endod.**, v.20, n.8, p.377-380, Aug. 1994.

HASHIOKA, K.; SUZUKI, K.; YOSHIDA, T.; NAKANE, A.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. Relationship between clinical symptoms and enzyme – producing bacterial isolated from infected root canal. **J. Endod.**, v.20, n.20, p.75-77, 1994.

HASHIOKA, K.; YAMASAKI, M.; NAKANE, A.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. The relationship between clinical synoptons and anaerobic bacteria from infected root canals. **J. Endod.**, v.18, n.11, p.558-561, 1992.

IEVEN, M.; BERGHER, D. A. V.; MERTENS, F.; VLIETINCK, A.; LAMMENS,E. Screening of higher plants for biological activities I. Antimicrobial activity. **Planta Medica**, v.36, n.3, p.311-321, 1979.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**, São Paulo: Editora Santos, 1995.

JORGE, L. I. F.; MARKMANN, B. E. O.. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira). **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.17, p.139-145, 1996.

KAISTHA, K. K.; KIER, L. B. Structural studies on the Triterpenes of *Schinus terebenthifolius*. **J. Pharmac. Scien.**, v.51, n.12, p.1136-1139, 1962.

KHEMALEELAKUL, S.; BAUMGARTNER, C.; PRUKSAKORN, S. Identification of bactéria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.94, n.6, p.746-755, 2002.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI 2001.

LAN, W. H. et al. A comparison of the morphological changes after Nd-YAG and CO2 laser irradiation of dentin surfaces. **J. Endod.**, v.26, n.8, p.450-453, 2000.

LANZONI, T. A. **Efeito do extrato de folhas da *Schinus terebenthifolius* Raddi sobre lesões transfixastes induzidas na mucosa lingual de ratos**. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná: Curitiba, 2006.

LEAL, L. B.; CAETANO, N.; ARAUJO, E.; SANTANA, D. P. Preparação e avaliação antimicrobiana de formas geleificadas de uso vaginal de aroeira-de-praia. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Florianópolis, 1996, 21p.

LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M.. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. São Paulo: Panamericana, 1995.

LEONARDO, M. R.; ROSSI, M. A.; SILVA, L. A. B.; ITO, I. Y.; BONIFÁCIO, K. Evaluation of bacterial biofilm and micoorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J. Endod.**, v.28, n.12, p.815-818, 2002.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **J. Endod.**, v.27, n.12, p.717-719, 2001.

LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, v.16, n.7, p.83-85, 2004.

LISBOA NETO, J. A.; MACHADO, J. L.; MELO JUNIOR, E. J. M. Avaliação do efeito cicatrizante da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e do mastruço (*Chenopodium ambrosioides*) em feridas de extração dental em ratos: estudo histológico. **Rev. ABO Nac.**, v.6, n.3, p.173-176, 1998.

LOPES, H. P; SIQUEIRA, J. F. JR. **Endodontia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação em cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. JR. Plantas medicinais: necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v.25, n.3, 2002.

MALCOLM, S. A.; SOFOWORA, E. A. Antimicrobial activity of selected Nigerian folk remedies and their constituent plants. **Loydia**, v.32, n.6, p.512-517, 1969.

MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J. Ethnopharm.**, v.52, p.171-174, 1996.

MARTINEZ, M. J.; GONZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana Del *Schinus terebenthifolius Raddi* (copal). **Rev. Cubana Plant. Med.**, 1:3, 37-39, 1996.

MEDICAL Laser. **Dentistry**. Disponível em:  
<<http://www.dekamela.com/medical5.htm>>. Acesso em: 26/06/2003.

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

MELO, E. J. M. JR.; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO, C. A. C. JR; SANT'ANA, A. E. G. Medicinal plants in healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, v.9, p.109-116, 2002.

MILLER, W. D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of dental pulp. **Dent. Cosmos**, 3636, 505-28, 1894

MOREIRA, M. Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD. **Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia**, Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2006.

NAGAYOSHI, M.; KITAMURA, C.; FUKUIZUMI, T.; NISHIHARA, T.; TRASHITA, M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **J. Endod.**, v.30, n.11, p.778-781, 2004.

NELSON FILHO, P.; LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; ASSED, S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus Calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. **J. Endod.**, v.28, n.10, p.694-696, 2002.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

OLIVEIRA, J. C. M. Antibióticos em endodontia. **RBO**, v.56, n.3, p.134-138, 1999.

PACIORNIK, E. J. **A planta nossa de cada dia: plantas medicinais, descrição e uso**. Curitiba: Copygraf, 1990.

PEREZ, C.; SUAREZ, C. Antifungal activity of plant extracts against *Cândida albicans*. **Amer. J. Chinese Med.**, v.25, n.2, p.181-184, 1997.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; van WINKELHOFF, A. J. Combination of bacterial species in endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v.35, n.8, p.698-702, 2002.

PLANTAS MEDICINAIS. Disponível em < [http://ci67.ciagri.usp.br/pm/ver\\_1pl.asp](http://ci67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp)>. Acesso em 20/03/2007.

RIBAS, M. O.; SOUZA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebenthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto Cienc. – Fac. Odonto/PUCRS**, v.21, n.53, 2006.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharm.**, v.100, p.80-84, 2005.

RÔÇAS, I.; SIQUEIRA, J. F. JR.; SANTOS, K.; COELHO, A. M. A. “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.91, n.4, p.468-471, 2001.

SILVA, C. L.; COLOMBI, D.; MACHADO, I.; MELLO, L. C.; CÉLERE, S. **FITOTERAPIA**. Disponível em < <http://www.comciencia.br/reportagens/fito/fito1.htm>>. Acesso em 23/03/2007.

SILVA, L.A. B.; NELSON FILHO, P.; LEONARDO, M. R.; ROSSI, M. A.; PANSANI, C. A. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. **J. Endod.**, v.28, n.2, p.94-98, 2002.

SIMÕES, C. M. **Plantas mdicinais populares do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 3ª ed, 1989.

SIQUEIRA, J. F. JR. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.94, n.3, p.281-293, 2002.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.94, n.4, p.494-498, 2002.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. N.; CARDOSO, C. C.; MACEDO, S. B.; LOPES, H. P. efeitos antibacterianos de um novo medicamento – o óleo ozonizado – comparados às pastas de hidróxido de cálcio. **Rev. Bras. Odont.**, v.57, n.4, p.252-256, 2000.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.92, p.451-7, 2001.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infections. **J. Endod.**, v.29, n.7, p.438-441, 2003.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I.; LOPES, H. P.; ELIAS, C. N.; UZEDA, M. Fungal infection of the radicular dentin. **J. Endod.**, v.28, n.11, p.770-773, 2002b.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I.; LOPES, H. P.; MAGALHÃES, F. A. C.; UZEDA, M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **J. Endod.**, v.29, n.8, p.501-504, 2003.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I.; SOUTO, R. B.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. *Actinomyces sp*, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in Primary Root Canal Infections. **J. Endod.**, v.28, n.3, p.168-172, 2002a.

SOUZA-GUGELMIN, M. C.; BRUGNERA JUNIOR, A.; LOPES, L. A.; PICOLI, F.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORÁ, J. D. Estudo da ação antimicrobiana dos lasers de Nd:YAG, CO2 e Er:YAG, na descontaminação de limas endodônticas. **Rev. Odont. Univ. Ribeirão Preto**, v.4, n.1, p.15-19, 2001.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infection. **J. Endod.**, v.15, v.1, p.13-19, 1989.

TSHIKLANGE, T. E.; MEYER, J. J. M.; HUSSEIN, A. A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. **J. Ethnopharm.**, v.96, p.515-519, 2005.

VELANO, H. E.; NASCIMENTO, L. C.; BARROS, L. M.; PANZERI, H. avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.15, n.1, p.18-22, 2001.

WEINE, F. S. Tratamento Endodôntico., 5ª ed., São Paulo: Santos, 1998.

XAVIER, M.N.A. **Fitoterapia no combate das afecções bucais**. 1<sup>st</sup>.Ed., Idéias, São Paulo, 1995.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (80%) BRUTOS E FRACIONADOS OBTIDOS DE FOLHAS EXTRAÍDAS DE PLANTAS COLETADAS NA REGIÃO DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL NO ANO DE 2002**

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias



TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Frações Associadas				
	Concentração de 850 µg/mL	1 + 2 + 3 + 4 + 5	1 + 2 + 3 + 4	1 + 2 + 3	1 + 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	-	-	-	-	-

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias; 1 Acetato; 2 Metanol; 3 Diclorometano; 4 éter de petróleo; 5 fração final.

## ANEXO 2

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (80%) FRACIONADOS OBTIDO A PARTIR DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS PROVENIENTES DE PLANTAS COLETAS NA REGIÃO DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL NO ANO 2005

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhasgens	Concentração $\mu\text{g/mL}$							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhasgens	Concentração $\mu\text{g/mL}$							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhasgens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (80%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhasgens	Frações Associadas			
	Concentração de 850 µg/mL			
	1 + 2 + 3 + 4 + 5	1 + 2 + 3 + 4	1 + 2 + 3	1 + 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	-	-	-	-

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias; 1 Metanol; 2 Acetato; 3 Diclorometano; 4 éter de petróleo; 5 fração final.

## ANEXO 3

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (30%) BRUTOS E FRACIONADOS DE FOLHAS PROVENIENTES DE PLANTAS COLETAS NA REGIÃO DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, NOS ANOS 2002 E 2005

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhagens	Concentração $\mu\text{g/mL}$							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus Terebenthifolius* RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhagens	Concentração $\mu\text{g/mL}$							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	$10^7$ ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Linhasgens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRAÇÃO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* RADDI, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Concentração µg/mL	0	200	450	650	850	1000	1500
Linhagens							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Concentração µg/mL	0	200	450	650	850	1000	1500
Linhagens							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias.



TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO/METANOL HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias.

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM µg/mL DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ÉTER DE PETRÓLEO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Linhagens	Concentração µg/mL							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Pseudomonas sp</i>	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	10 <sup>7</sup> ufc	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias.

TABELA 9 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE DICLOROMETANO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Linhagens							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias.

TABELA 10 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DO EXTRATO FRACIONADO DE ACETATO DE ETILA HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Linhagens							
	0	200	450	650	850	1000	1500	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias

TABELA 11 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2002

Frações Associadas Concentração de 850 $\mu\text{g/mL}$	Linhagens			
	1 + 2 + 3 + 4 + 5	1 + 2 + 3 + 4	1 + 2 + 3	1 + 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^3\text{ufc}$	$10^3\text{ufc}$	$10^3\text{ufc}$	$10^3\text{ufc}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^5\text{ufc}$	$10^5\text{ufc}$	$10^5\text{ufc}$	$10^5\text{ufc}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^6\text{ufc}$	$10^6\text{ufc}$	$10^6\text{ufc}$	$10^6\text{ufc}$
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^2\text{ufc}$	$10^2\text{ufc}$	$10^2\text{ufc}$	$10^2\text{ufc}$

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias; 1 Metanol; 2 Acetato; 3 Diclorometano; 4 éter de petróleo; 5 fração final.

TABELA 12 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA EM  $\mu\text{g/mL}$  DE MEIO (BHI-S) DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (30%) DE FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi, OBTIDO DE PLANTAS DO LITORAL DE GUARAQUEÇABA, PARANÁ, BRASIL, EM 2005

Frações Associadas Concentração de 850 $\mu\text{g/mL}$	Linhagens			
	1 + 2 + 3 + 4 + 5	1 + 2 + 3 + 4	1 + 2 + 3	1 + 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27213	$10^4\text{ufc}$	$10^4\text{ufc}$	$10^4\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^6\text{ufc}$	$10^6\text{ufc}$	$10^6\text{ufc}$	$10^6\text{ufc}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$
<i>Pseudomonas sp</i>	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$	$10^7\text{ufc}$
<i>Staphylococcus sp</i> Coagulase -	$10^3\text{ufc}$	$10^3\text{ufc}$	$10^3\text{ufc}$	$10^3\text{ufc}$

Legenda: UFC unidades formadoras de colônias; 1 Metanol; 2 Acetato; 3 Diclorometano; 4 éter de petróleo; 5 fração final.

## APÊNDICE

## APÊNDICE I

### Meios de Culturas e Soluções

#### Solução de Hemina e Vitamina K

Frasco de 5mL contendo 555mg/L de hemina de bovina; 8,88 mL/L de solução de vitamina K e 11,1mL/L de solução de hidróxido de sódio 1N

Fabricante: Newprov produtos para laboratório – Rua 1° de maio, 596 Pinhais – PR.

#### BHI-S – Brain Heart Infusion (Infusão de Coração e Cérebro Bovino)

Suplementado

BHI (desidratado).....14,8g

Extrato de Levedura.....2,0g

Ágar-ágar.....8,0g

Água destilada.....400mL

Esterilização a 120°C por 20 minutos

Acréscimo da solução de Hemina/Vit. K

#### Tioglicolato Suplementado

Tioglicolato desidratado.....11,8g

Água destilada.....400mL

Esterilização a 120°C por 20 min.

Acréscimo da solução de Hemina/Vit. K

#### Ágar Simples

Cloreto de Sódio.....4g

Peptona.....10g

Extrato de carne.....4g

Água destilada.....1000mL

Ágar.....15g

Esterilização a 120°C por 20 min.