

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

ISABELA TOMAZINI SABINO

VANESSA RAQUEL GREATTI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE
PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADAS
À BIOPRODUTOS FRENTE A LINHAGENS GRAM
POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

BAURU
2012

**ISABELA TOMAZINI SABINO
VANESSA RAQUEL GREATTI**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE
PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADAS
À BIOPRODUTOS FRENTE A LINHAGENS GRAM
POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth e coorientação dos Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, Prof. Ms. Fernando T. A. Neves e Prof.^a Esp. Claudia Sibely Salomão C. de Paula.

BAURU
2012

S116a

Sabino, Isabela Tomazini

Atividade antibacteriana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associadas à bioprodutos frente a linhagens Gram positivas e Gram negativas / Isabela Tomazini Sabino, Vanessa Raquel Greatti -- 2012.

49f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)
- Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Hidróxido de cálcio. 2. Medicação intracanal. 3. Bioprodutos. 4. Atividade antibacteriana. I. Greatti, Vanessa Raquel. II. Weckwerth, Paulo Henrique. III. Título.

**ISABELA TOMAZINI SABINO
VANESSA RAQUEL GREATTI**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE PASTAS DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADAS À BIOPRODUTOS FRENTE A
LINHAGENS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, como requisito para obtenção do título de bacharel em farmácia, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth e coorientação dos Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, Prof. Ms. Fernando T. A. Neves e Prof.^a Esp. Cláudia Sibely Salomão C. De Paula.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Centro de Ciências da Saúde- Universidade Sagrado Coração

Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan

Centro de Ciências da Saúde- Universidade Sagrado Coração

Prof. Ms. Bruno Cavalini Cavenago

Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB- USP

Bauru, 05 de dezembro de 2012.

Dedicamos este trabalho aos nossos pais, Rosana Tomazini Sabino e Marcos Antônio Sabino; Maria Valquiria Zanetti Greatti e Antonio Walter Greatti.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus, ao nosso orientador Dr. Paulo Henrique Weckwerth pela atenção e confiança, nossos coorientadores Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, Prof. Ms. Fernando T. Alves Neves e Prof.^a Esp. Cláudia Sibely Salomão C. De Paula, aos funcionários dos laboratórios de indústria de medicamentos e de análises clínicas da universidade, que nos deram incentivo e apoio para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

O hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 é um pó branco, altamente alcalino que, em endodontia, tem sido utilizado em pulpotomias, tratamento de perfurações radiculares, como componente de cimentos obturadores e como medicação intracanal, sendo que quando utilizado nesta última situação, é associado a um veículo com a finalidade de se obter a consistência de pasta. Assim, diferentes veículos têm sido propostos para associação ao Ca(OH)_2 . A atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 está relacionada a liberação de íons hidroxila. Estes íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que reagem com inúmeras biomoléculas. Apesar de sua ampla utilização, esta substância não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de micro-organismos *in vivo*. O propósito da presente pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de várias pastas de Ca(OH)_2 associadas com bioprodutos contra linhagens ATCC de *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. O teste de susceptibilidade bacteriana frente às pastas foi realizado pelo método da difusão das pastas sobre ágar Mueller-Hinton. A atividade antibacteriana dos bioprodutos na forma de extratos e de gel isolados foi realizada também pelo método da difusão. Obtidos os dados, os mesmos foram submetidos a análise estatística, empregando-se o teste Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. A clorexidina, tanto a 1% como a 2%, mostrou grande atividade antibacteriana pura, na forma de gel e associada como veículo ao Ca(OH)_2 , estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Todas as pastas de Ca(OH)_2 revelaram efetividade contra todos os micro-organismos testados com exceção da pasta cujo veículo foi o óleo de alho. Frente ao *St. pyogenes*, somente as pastas de clorexidina 1% e 2% revelaram efetividade. Os extratos puros e os géis da aroeira-da-praia e aroeira vermelha revelaram efetividade contra *S. aureus* e contra as duas linhagens de *E. faecalis*. O extrato puro e gel da pariparoba demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e contra o *St. pyogenes*. O extrato da própolis revelou efetividade contra *E. coli* e *St. pyogenes*. As pastas de Ca(OH)_2 cujos veículos puros revelaram atividade antibacteriana, não foram potencializadas para atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio. Medicação intracanal. Bioprodutos. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Calcium hydroxide Ca(OH)_2 is a white powder, highly alkaline, in endodontics has been used in pulpotomies, treatment of root perforations, as component sealers and as dressing, and when used in the latter, is associated with a vehicle in order to obtain a pulp consistency. Thus, different vehicles have been proposed for membership in the Ca(OH)_2 . The antimicrobial activity of Ca(OH)_2 is related to the release of hydroxyl ions. These hydroxyl ions are highly oxidizing free radicals that react with many biomolecules. Despite its widespread use, this substance has proven effective on some strains of micro-organisms in vivo. The purpose of this research was to evaluate the in vitro antibacterial activity of several pastes of Ca(OH)_2 associated with bioproducts against ATCC strains of *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The testing of bacterial susceptibility front of the pastes was performed by the method of diffusion of paste on Mueller-Hinton agar. The antibacterial activity of bioproducts in the form of gel extracts and isolates was also held by the diffusion method. Obtained data, they were subjected to statistical analysis, using the Kruskal-Wallis test with significance level of 5%. Chlorhexidine, both at 1% and 2%, showed a high antibacterial activity pure in the form of gel as vehicle and is associated to Ca(OH)_2 , statistically significant ($p < 0.05$). All pastes of Ca(OH)_2 proved effective against all micro-organisms tested except the paste whose vehicle was garlic oil. Front *St. pyogenes*, only pastes chlorhexidine 1% and 2% showed effectiveness. The pure extracts and gels from-the-beach mastic and mastic red showed effectiveness against *S. aureus* and against the two strains of *E. faecalis*. The pure extract and gel pariparoba demonstrated antimicrobial activity against *S. aureus* and against *St. pyogenes*. The extract of propolis showed effectiveness against *E. coli* and *St. pyogenes*. The paste of Ca(OH)_2 whose vehicles showed pure antibacterial activity, were not potentiated for antibacterial activity.

Key-words: Calcium hydroxide. Intracanal medication. Bioproducts. Antibacterial activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Partes utilizadas na preparação dos extratos.....	20
Tabela 2. Pastas de hidróxido de cálcio e seus diferentes veículos utilizados na avaliação da atividade antibacteriana.....	22
Tabela 3. Halos de inibição em mm dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos puros e controles positivos e negativo.....	25
Tabela 4. Halos de inibição de mm dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos e controles positivos em géis e controle negativo.....	25
Tabela 5. Halos de inibição em mm dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos e controles positivos e negativo associados ao Ca(OH)_2	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrão de sensibilidade do <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) frente às pastas associadas aos bioprodutos.....	27
Figura 2. Padrão de sensibilidade do <i>E. faecalis</i> (ATCC 19433) frente a bioprodutos e géis.....	27
Figura 3. Padrão de sensibilidade da <i>E. coli</i> (ATCC 25922) frente ao extrato de própolis.....	28
Figura 4. Padrão de sensibilidade da <i>E. coli</i> (ATCC 25922) frente ao gel de própolis.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3 MATERIAL E MÉTODO	20
3.2 MÉTODO PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	20
3.3 PROCESSO PARA OBTENÇÃO DOS GÉIS.....	21
3.4 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PASTAS DE Ca(OH) ₂ PELO MÉTODO DA DIFUSÃO	21
3.5 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS BIOPRODUTOS NA FORMA DE EXTRATOS ISOLADOS PELO MÉTODO DA DIFUSÃO	23
3.6 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS BIOPRODUTOS NA FORMA DE GEL PELO MÉTODO DA DIFUSÃO.....	23
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO

O hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 caracteriza-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de água, à 25°C). É obtido pela calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio que, após hidratação resulta em hidróxido de cálcio (ESTRELA et al., 1995). Baseado no peso molecular da substância, a porcentagem de íons hidroxila e íons cálcio encontrados no Ca(OH)_2 corresponde a 45,89% e 54,11%, respectivamente (ESTRELA, PESCE, 1995).

Em Endodontia o Ca(OH)_2 tem sido utilizado em pulpotomias, tratamento de perfurações radiculares, como componente de cimentos obturadores e como medicação intracanal, sendo que quando utilizado nesta última situação, é associado a um veículo com a finalidade de se obter a consistência de pasta. Assim, diferentes veículos têm sido propostos para associação ao Ca(OH)_2 (ESTRELA et al., 2001).

O emprego do Ca(OH)_2 em casos de necrose pulpar tem o propósito de promover ação antisséptica sobre micro-organismos, além da ação biológica, atributos que são conseguidos pelo elevado pH através da liberação de íons hidroxila e liberação de íons cálcio, respectivamente.

A atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 está relacionada a liberação de íons hidroxila. Estes íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que reagem com inúmeras biomoléculas.

Siqueira e Lopes, 1999, revelaram que os mecanismos de atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 são caracterizados pelos danos diretos a membrana citoplasmática bacteriana, desnaturação proteica e danos ao DNA bacteriano.

Recentes estudos revelaram a classificação e indicações clínicas de várias formulações de pastas de Ca(OH)_2 (ESTRELA et al., 1999; FAVA et al., 1999).

Gomes et al., 2002, revelaram que a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes pastas de Ca(OH)_2 foi influenciada pelo tipo de veículo utilizado, sendo que a melhor atividade antimicrobiana foi obtida com para-monoclorofenol canforado. Este estudo revelou que bactérias anaeróbias Gram negativas são mais susceptíveis ao Ca(OH)_2 em relação aos micro-organismos Gram positivos facultativos.

Evans et al., 2003, avaliando a atividade antimicrobiana de duas pastas de Ca(OH)_2 em dentina bovina contaminada com *Enterococcus faecalis*, revelaram a melhor eficiência da pasta com veículo clorexidina a 2%.

Várias substâncias têm sido associadas ao Ca(OH)_2 com o propósito de potencializar sua ação antisséptica.

Sirén et al., 2004, avaliaram o efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 combinado com clorexidina e com iodo-iodeto de potássio sobre uma linhagem padrão de *E. faecalis*. Os resultados deste estudo revelaram a efetividade na desinfecção de dentina bovina contaminada quando o Ca(OH)_2 foi adicionado de clorexidina ou iodo-iodeto de potássio.

Pacios et al., 2004, avaliando a influência de seis diferentes veículos (água destilada, clorexidina, propilenoglicol, solução anestésica, paramonoclorofenol canforado e paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol) sobre o pH de pastas de Ca(OH)_2 *in vivo* e *in vitro*, revelaram que em ambas condições o pH manteve-se constante durante todas as variáveis de tempo analisadas, sendo que a pasta cujo veículo foi água destilada mostrou-se com pH superior em condição clínica.

Schäfer e Bössmann, 2004, compararam a atividade antimicrobiana da clorexidina pura com duas diferentes pastas de Ca(OH)_2 : uma comercial e outra cujo veículo foi clorexidina em proporção igual peso:peso, sobre dentina humana contaminada com *E. faecalis* ATCC 6057. Neste estudo os pesquisadores revelaram que clorexidina pura mostrou-se mais eficiente quando comparada a pasta de Ca(OH)_2 com veículo clorexidina na desinfecção da dentina contaminada. Pesquisa semelhante realizada por Ercan et al., 2006, revelou que a clorexidina gel a 2% foi mais efetiva na eliminação de *E. faecalis* e *Candida albicans* quando comparado com as pastas de Ca(OH)_2 com veículo água estéril e clorexidina 2%.

A desinfecção de túbulos dentinários humanos infectados com *E. faecalis* ATCC 29212 por três diferentes pastas de Ca(OH)_2 (veículo água, veículo iodo-iodeto de potássio e pasta Metapex[®], esta última contendo iodofórmio e óleo de silicone) foi avaliada por Cwikla et al., 2004. Este estudo demonstrou que a pasta Metapex[®] revelou melhor atividade antibacteriana quando comparado às outras pastas.

A avaliação *in vitro* da susceptibilidade de patógenos endodônticos a pastas de Ca(OH)_2 combinadas com diferentes veículos foi demonstrada por Vianna et al., 2005. Neste estudo as pastas foram preparadas com veículo água estéril, glicerina,

paramonoclorofenol canforado, paramonoclorofenol canforado + glicerina, polietilenoglicol e paramonoclorofenol canforado + polietilenoglicol. Bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas foram mais resistentes ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e o tempo necessário para a eliminação dos micro-organismos variou de 4 a 24 horas. Bactérias anaeróbias foram eliminadas dentro de 5 minutos ou menos. *E. faecalis* e *C. albicans* foram os micro-organismos mais resistentes frente as pastas utilizadas.

Avaliando a influência do iodofórmio no potencial antimicrobiano de pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Estrela et al., 2006, revelaram que as pastas com solução salina e com iodofórmio e salina mostraram significativa atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans* pelos métodos do contato direto e difusão da substância sobre placas de ágar.

Objetivando avaliar a atividade antibacteriana residual de várias pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ após permanecerem 21 dias em canais radiculares de cães com lesões periapicais, Soares et al., 2007, utilizaram o método da difusão sobre placas de ágar Mueller-Hinton contaminadas com *Micrococcus luteus* ATCC 9341 a partir das pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com veículo solução anestésica e clorexidina a 2% e as pastas Calen[®] e Calen[®] + paramonoclorofenol canforado. A pasta de melhor atividade antibacteriana residual foi aquela cujo veículo foi digluconato de clorexidina a 2%.

A atividade antimicrobiana de diferentes pastas de hidróxido de cálcio frente a *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *E. faecalis*, *St. sobrinus*, *St. sanguis*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* foi avaliada pelo método da difusão por Souza-Filho et al., 2008. Os autores utilizaram no estudo as pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2%, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2% + iodofórmio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2% + óxido de zinco e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + água. Os resultados revelaram que todas as pastas demonstraram alguma atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados. *C. albicans*, *E. faecalis* e *St. sanguis* foram os micro-organismos mais resistentes. *St. mutans* revelou grandes zonas de inibição no experimento.

Silveira et al., 2011, avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ combinada com clorexidina e outras substâncias contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *St. mutans*. Os autores utilizaram pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina gel 2%, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + propilenoglicol e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + solução salina. Utilizaram o teste de diluição

em caldo de cultura e quantificaram o tempo necessário para as pastas inibirem o crescimento bacteriano. Os resultados revelaram que as pastas de Ca(OH)_2 + paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol e Ca(OH)_2 + propilenoglicol eliminaram todas as células bacterianas em 15 segundos. A pasta de Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2% necessitou de 45 segundos para eliminar *S. aureus* e *E. faecalis*. A pasta de Ca(OH)_2 + solução salina necessitou de 45 segundos para eliminar *E. faecalis*. Assim, pode-se concluir que *E. faecalis* foi a bactéria mais resistente, seguido pelo *S. aureus*.

A susceptibilidade do *E. faecalis* frente a pasta de Ca(OH)_2 e aos antibióticos amoxicilina + clavulanato de potássio, ciprofloxacina, clindamicina e doxiciclina foi avaliada *in vitro* em dentes humanos por Saber et al., 2012. Dentes pré-molares mandibulares humanos foram instrumentados, autoclavados e contaminados com um isolado clínico de *E. faecalis* para que houvesse a formação de biofilme, revelado por microscopia eletrônica de varredura nos intervalos de três, dez, vinte e trinta dias. Os medicamentos foram preparados pela concentração inibitória mínima para *E. faecalis* na forma de pastas e introduzidos nos canais infectados. Após uma semana, cones absorventes foram utilizados para coleta dos espécimes e contagem através de cultura bacteriológica. Os resultados revelaram que nenhum dos antibióticos e nem a pasta de Ca(OH)_2 foram eficazes na eliminação do biofilme. Porém, todos os antibióticos foram mais eficazes na redução do número de Unidades Formadoras de Colônias mL^{-1} quando comparados a pasta de Ca(OH)_2 . O efeito antimicrobiano da amoxicilina + clavulanato de potássio, ciprofloxacina e clindamicina foi, estatisticamente melhor, em relação ao efeito da doxiciclina.

Outros estudos comparando a atividade do Ca(OH)_2 com antibióticos são encontrados na literatura, como o estudo de Pavaskar et al., 2012, onde os pesquisadores compararam a efetividade da linezolida em relação ao Ca(OH)_2 . Num estudo *in vitro* utilizando dentes humanos, pré-molares, instrumentados e contaminados com células planctônicas de *E. faecalis* ATCC 29212, os pesquisadores revelaram que após o tratamento dos espécimes por três, oito e 14 dias com Ca(OH)_2 , Vitapex[®], linezolida e Ca(OH)_2 + linezolida, somente linezolida mostrou-se eficaz na eliminação do *E. faecalis*, seguida pela associação de Ca(OH)_2 + linezolida.

Novas alternativas têm sido buscadas para o emprego na terapia endodôntica como a utilização de produtos naturais como a própolis. Objetivando avaliar a

atividade antimicrobiana de duas pastas de hidróxido de cálcio associadas a extrato etanólico e não etanólico de própolis, Rezende, et al., 2008, submeteram culturas polimicrobianas de molares decíduos necrosados ao teste de difusão sobre placas de ágar cérebro e coração em atmosfera anaeróbica. Ambas as pastas apresentaram zonas de inibição maiores quando comparadas ao grupo controle com pasta de veículo propilenoglicol.

Novos veículos para pastas de Ca(OH)_2 , como por exemplo, fitoterápicos, devem ser testados com o objetivo de avaliar uma provável potencialização da pasta para eliminar *E. faecalis* e outros micro-organismos de canais radiculares, já que estes bioprodutos têm revelado atividade antimicrobiana frente a vários micro-organismos.

Pereira et al., 2005, avaliaram a eficácia de extratos de *Arctium lappa* L. (bardana) frente a micro-organismos comumente encontrados na cavidade oral como *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Segundo estes pesquisadores, a fase hexânica obtida da planta mostrou grande atividade contra estes microrganismos em questão, particularmente contra *E. faecalis*, um germe presente na cavidade oral e que se envolve com o insucesso do tratamento endodôntico.

Gentil et al., 2006, compararam a atividade antimicrobiana da bardana com outros medicamentos utilizados em curativos endodônticos. Naquele estudo, 27 dentes caninos maxilares foram instrumentados, esterilizados, selados na porção apical e inoculados com uma suspensão bacteriana mista constituída de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Um curativo com pasta de hidróxido de cálcio em propilenoglicol, um curativo com extrato propilenoglicólico de bardana e um curativo só com propilenoglicol (controle) foram utilizados e avaliados após 7, 14 e 30 dias. *Actium lappa* L. inibiu o crescimento de toda microbiota contaminante em 14 e 30 dias.

Souza et al., 2007, avaliaram a ação antimicrobiana de quatro diferentes extratos da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), popularmente conhecida por barbatimão frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 10536. Os autores verificaram que a melhor atividade antimicrobiana foi revelada nos extratos obtidos em etanol 50%, etanol 70% e acetona: água (7:3 v/v) contra todos os micro-organismos testados.

Johann et al., 2007, testaram a atividade de oito plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira contra fungos patógenos clinicamente relevantes. Dentre as plantas testadas, a aroeira-da-praia revelou grande atividade antifúngica contra *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii*. As outras plantas revelaram atividade antifúngica contra pelo menos uma das espécies testadas.

Weckwerth et al., 2008, avaliaram a efetividade de dos extratos de *Casearia sylvestris* Sw (guaçatonga) aquoso e obtidos a partir de etanol, álcool de cereais e propilenoglicol, contra 50 linhagens de *E. faecalis* isolados da cavidade oral, pelo método da difusão em placas de ágar. Verificou-se que o extrato propilenoglicólico revelou os melhores halos de inibição, sendo efetivo contra 68% das linhagens estudadas.

Costa et al., 2010, avaliaram a ação antimicrobiana de extratos etanólicos da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi), da aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* [Fr. All.] Engl.), da ameixa-do-mato (*Ximenia americana* L.) e da quixabeira (*Syderoxylum obtusifolium* [Roem et Schult.]) frente a uma linhagem de *E. faecalis* ATCC 29212. Os autores verificaram que a aroeira-da-praia e aroeira-do-sertão apresentaram halos de inibição maiores na concentração de 100% em relação às outras duas espécies vegetais e em relação ao hipoclorito de sódio.

Weckwerth et al., 2011, avaliaram a efetividade antimicrobiana de três diferentes pastas de Ca(OH)_2 com veículos extrato propilenoglicólico de guaçatonga, clorexidina a 1% em propilenoglicol e propilenoglicol puro. Os testes foram realizados pelo contato direto em cones de papel contaminados com 40 linhagens de *E. faecalis*. Neste estudo, todas as linhagens foram inibidas pelas três diferentes pastas.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas utilizadas no cotidiano também tem sido avaliada.

Avaliando a atividade inibitória de extrato de alho sobre *Streptococcus mutans* multi-resistente a drogas, Fani et al., 2007, recuperaram 92 linhagens de 105 dentes cariosos. Vinte e oito cepas multi-resistentes e 28 não multi-resistentes foram testadas pelo método da difusão sobre placas de ágar. Os resultados revelaram que todas as linhagens foram inibidas pelo extrato de alho, com halos de inibição variando de 22 até > 42 mm.

A atividade antibacteriana *in vitro* de extrato aquoso e gel tópico de alicina contra *Streptococcus* do grupo de B de Lancefield foi avaliada por Cutler et al., 2009.

Setenta e seis linhagens de *Streptococcus* do grupo B foram testadas para concentração inibitória e bactericida mínimas. Os resultados revelaram que tanto o extrato aquoso, como o extrato incorporado ao gel demonstraram atividade bactericida contra o micro-organismo.

Borhan-Mojabi et al., 2012, avaliaram a eficácia de diferentes concentrações de extratos de alho (*Allium sativum*) na redução de micro-organismos da cavidade oral. Neste estudo, extrato hidroalcoólico de alho foi colocado em contato direto com a saliva de 40 pacientes. O extrato mostrou-se efetivo na redução da microbiota oral avaliada em unidades formadoras de colônias sobre placas de TSA ágar.

A atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 se dá pela liberação de íons hidroxila e consequente aumento de pH, podendo atingir 11 a 12,5 (ESTRELA et al., 1998). Os efeitos letais desses íons hidroxila sobre as células bacterianas devem-se, principalmente, aos danos ocasionados na membrana citoplasmática, a desnaturação de proteínas e danos diretos ao DNA (SIQUEIRA et al., 1999). Esta atividade também é resultante da presença de cálcio que remove gás carbônico, fonte respiratória de bactérias anaeróbias (KONTAKIOTIS et al., 1995). Outro importante fator está no fato do Ca(OH)_2 inibir o lipopolissacarídeo, componente agressor presente na membrana externa da parede de bactérias Gram negativas (SAFAVI; NICHOLS, 1993;SAFAVI; NICHOLS, 1994;TANOMARU et al., 2003).

Para ser efetivo contra bactérias localizadas dentro do túbulo dentinário, os íons hidroxila do Ca(OH)_2 devem difundir-se na dentina em concentrações suficientes para sobrepujar seu efeito tampão e, conseqüentemente, aumentar drasticamente o pH local.

As pastas de Ca(OH)_2 em diferentes veículos e concentrações tem sido o material de escolha como medicação intracanal por seu alto poder alcalinizante criando um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano.

Apesar de sua ampla utilização, esta substância não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de micro-organismos “*in vivo*”. Um desses micro-organismos é o *E. faecalis*.

O *E. faecalis* é um coco Gram positivo presente principalmente em casos de insucesso endodôntico que tem mostrado elevada resistência ao Ca(OH)_2 (SUNDQVIST et al., 1998; ROÇAS et al., 2004).

Seus fatores de virulência têm sido amplamente estudados. Produzem citolisinas com atividade sobre hemácias humanas, ovinas e de cavalo. A substância

de agregação é uma proteína codificada por plasmídeos responsável pela aglutinação dos microrganismos para facilitar a troca entre plasmídeos. As estirpes de *E. faecalis* produzem feromonas, peptídeos capazes de amplificar a transferência de DNA plasmidial por estirpes em processo conjugativo e também de amplificar a resposta inflamatória durante o processo infeccioso (KAYAOGLU & ØRSTAVIK, 2004).

O ácido lipoteicóico é, além de adesina, um importante fator de virulência por induzir fator de necrose tumoral (TNF), modulando de forma agressiva a resposta imune. Produzem várias enzimas extracelulares como gelatinase e hialuronidase (KAYAOGLU & ØRSTAVIK, 2004).

A recuperação frequente do *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (SUNDQVIST et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; RÖÇAS et al. 2004).

Demonstram alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento e este é um dos poucos micro-organismos que tem mostrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002).

McHugh et al., 2004, avaliaram o pH necessário para matar *E. faecalis* ATCC 29212 *in vitro* e concluíram que, entre pH 10.5 até 11.0 pode ocorrer retardo no crescimento do micro-organismo e somente em pH 11.5 ou superior, ocorre a morte.

Evans et al., 2002, verificaram que a resistência desse micro-organismo ao Ca(OH)_2 está relacionada a uma bomba de prótons.

Diante da resistência do *E. faecalis* ao Ca(OH)_2 , diferentes substâncias têm sido utilizadas no preparo das pastas a fim de potencializar a sua ação antimicrobiana frente a esse micro-organismo. Há uma busca incessante pela busca de agentes fitoterápicos na medicina e odontologia. Dentro da endodontia, busca-se uma substância que potencialize os efeitos biológicos e antimicrobianos do hidróxido de cálcio como curativo de demora. Uma nova opção como veículo para estas pastas seriam os bioprodutos, particularmente os vegetais.

O propósito da presente pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de várias pastas de Ca(OH)_2 associadas com diferentes bioprodutos contra duas linhagens ATCC de *E. faecalis*, cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), *Streptococcus pyogenes* (Gram positiva), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) e *Escherichia coli* (Gram negativa).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- A presente pesquisa teve como objetivo geral avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de várias pastas de Ca(OH)_2 associadas à bioprodutos como veículos, além dos bioprodutos isolados contra as seguintes linhagens bacterianas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram positiva), *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (Gram positiva), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (Gram positiva), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram negativa) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativa).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* pelo método da difusão de pastas de hidróxido de cálcio associadas a extrato hidroalcoólico de bardana, extrato hidroalcoólico de guaçatonga, extrato hidroalcoólico de pariparoba, extrato hidroalcoólico de aroeira vermelha, extrato hidroalcoólico de aroeira-da-praia, extrato hidroalcoólico de alho, extrato de própolis e óleo de alho contra as seguintes linhagens bacterianas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram positiva), *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (Gram positiva), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (Gram positiva), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram negativa) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativa).
- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* pelo método da difusão dos diferentes bioprodutos na forma de extratos puros e de gel isoladamente.
- Revelar a sensibilidade de duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis* frente a estes bioprodutos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.2 MÉTODO PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As partes utilizadas da planta foram: folhas, talo e casca especificados na Tabela 1; foram obtidas através das empresas Santos Flora (São Paulo- SP) e Max Pharma (São Paulo- SP), os laudos analíticos constam nos anexos A, B, C, D e E.

Estas foram submetidas ao processo de moagem por meio de moinho de facas e tamisação em malha (212 mm). Após este processo o pó obtido foi fracionado em frascos contendo 6,5 gramas e 100 mL de álcool 70°GL. As soluções obtidas foram submetidas aos processos de aquecimento 40°C e à agitação por 10 minutos. Este processo foi realizado durante sete dias. Após este período, os extratos foram filtrados a vácuo (para frascos esterilizados) e envasados em capela de fluxo laminar.

Para o alho comercial, utilizou-se um espremedor de alho e pesou-se a mesma massa, porém este foi incorporado diretamente à uma solução hidroalcoólica (70°GL), posteriormente realizou-se a mesma metodologia anteriormente descrita.

Tabela 1. Partes utilizadas na preparação dos extratos

Nome científico	Parte utilizada
<i>Piper umbellatum</i> (Pariparoba)	Folhas e talo
<i>Arctium lappa</i> (Bardana)	Folhas
<i>Casearia sylvestris</i> (Guaçatonga)	Folhas e talo
<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira-da-praia)	Casca
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Aroeira vermelha)	Casca
<i>Allium cepa</i> (alho comercial)	Bulbo

Foram utilizadas cápsulas de óleo de alho 250 mg, e extrato de própolis obtidos através da Farmácia Véritas (Bauru- SP), das marcas Vadequímica (São Paulo- SP) e Purifarma (São Paulo- SP) respectivamente. Os laudos analíticos constam nos anexos F e G. Foram utilizados clorexidina em propilenoglicol 1 e 2% como controle positivo, e propilenoglicol como controle negativo.

3.3 PROCESSO PARA OBTENÇÃO DOS GÉIS

A concentração dos bioprodutos nos géis foi de 10% em relação ao volume final, utilizou-se 10 g do extrato para cada 100 gramas de gel; foram utilizados também clorexidina em propilenoglicol a 1 e 2% como controle positivo, propilenoglicol como controle negativo e os mesmos foram manipulados na farmácia Véritas.

3.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PASTAS DE Ca(OH)_2 PELO MÉTODO DA DIFUSÃO

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* das pastas de Ca(OH)_2 , todas as linhagens em estudo, pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia da Universidade Sagrado Coração (USC, Bauru, SP, Brasil) foram ativadas sobre a superfície de placas de ágar, conforme a cepa em questão. Assim, duas cepas ATCC 29212 e ATCC 19433 de *E. faecalis* foram ativadas sobre ágar M-Enterococcus, uma linhagem de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foi ativada sobre ágar Cetremide, uma linhagem de *S. aureus* (ATCC 25923) foi ativada sobre ágar Manitol, uma linhagem de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) foi ativada sobre Brucella ágar sangue e uma linhagem de *E.coli* (ATCC 25922) foi ativada sobre ágar Mac Conkey, Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, em condições atmosféricas de aerobiose por 24-48 h. Após o período de ativação, todas as linhagens foram testadas quanto à pureza da cultura e novamente identificadas por métodos padrões de identificação bacteriana. Os laudos analíticos constam nos anexos H, I, J, K, L, M respectivamente.

A partir das culturas, cinco colônias foram inoculadas em tubos contendo quatro mL de caldo BHI estéril que foram incubados “overnight” a 37°C, em condições atmosféricas de aerobiose. Estas sub-culturas em caldo BHI foram transferidas para tubos contendo cinco mL de solução salina estéril a fim de se obter uma turbidez padrão referente à escala 0,5 de Mac Farland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL^{-1} .

Placas de Petri de 15x150 mm preparadas com ágar Mueller-Hinton foram escavadas em poços com 4 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Para os

testes com *St. pyogenes*, placas de ágar Mueller-Hinton foram preparadas adicionando-se 5% de sangue de carneiro. A superfície de cada placa foi semeada com uma zaragatoa de algodão estéril embebida na suspensão padrão, tomando-se o cuidado de preservar as escavações sem semeadura. Após a semeadura, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para absorção do inóculo.

As pastas de Ca(OH)_2 foram manipuladas a partir do pó da marca biodinâmica (Ibiporã- PR), até se obter a consistência de creme dental (tabela 2). Seringas estéreis de 3 mL foram utilizadas para o preenchimento dos poços com as diferentes pastas.

Tabela 2. Pastas de hidróxido de cálcio e seus diferentes veículos utilizados na avaliação da atividade antibacteriana.

Nº Formulação	Massa (g) Ca(OH)_2	Veículo (mL)
1	0,5	0,4 de clorexidina a 1%
2	0,5	0,4 de clorexidina a 2%
3	0,5	0,6 de propilenoglicol
4	0,5	0,6 de extrato de própolis
5	0,5	0,6 de extrato hidroalcoólico de bardana
6	0,5	0,6 de extrato hidroalcoólico de guaçatonga
7	0,5	0,6 de extrato hidroalcoólico de pariparoba
8	0,5	0,6 de extrato hidroalcoólico de aroeira vermelha
9	0,5	0,6 de extrato hidroalcoólico de aroeira-da-praia
10	0,5	0,5 de extrato hidroalcoólico de alho
11	0,5	0,6 de óleo de alho

Após o preenchimento dos poços, as placas foram mantidas em temperatura ambiente para pré-incubação por duas horas e depois foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, utilizando-se um paquímetro digital, os halos de inibição bacteriana foram mensurados em milímetros sob luz transmitida.

3.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS BIOPRODUTOS NA FORMA DE EXTRATOS ISOLADOS PELO MÉTODO DA DIFUSÃO

A partir das culturas, cinco colônias foram inoculadas em tubos contendo quatro mL de caldo BHI estéril que foram incubados “overnight” a 37°C, em condições atmosféricas de aerobiose. Estas sub- culturas em caldo BHI foram transferidas para tubos contendo cinco mL de solução salina estéril a fim de se obter uma turbidez padrão referente à escala 0,5 de Mac Farland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL⁻¹.

Placas de Petri de 15x150 mm preparadas com ágar Mueller-Hinton foram escavadas em poços com 4 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Para os testes com *St. pyogenes*, placas de ágar Mueller-Hinton foram preparadas adicionando-se 5% de sangue de carneiro. A superfície de cada placa foi semeada com uma zaragatoa de algodão estéril embebida na suspensão padrão, tomando-se o cuidado de preservar as escavações sem semeadura. Após a semeadura, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para absorção do inóculo.

Posteriormente, 20 µL de cada bioproducto foram colocados nas escavações com pipeta automática e ponteira estéril. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por duas horas para que a substância pudesse ser absorvida pelo meio de cultura. Após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas para posterior avaliação da atividade antibacteriana dos bioproductos.

Posteriormente o período de incubação, utilizando-se um paquímetro digital, os halos de inibição bacteriana foram mensurados em milímetros sob luz transmitida.

3.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS BIOPRODUTOS NA FORMA DE GEL PELO MÉTODO DA DIFUSÃO

A partir das culturas, cinco colônias foram inoculadas em tubos contendo quatro mL de caldo BHI estéril que foram incubados “overnight” a 37°C, em condições atmosféricas de aerobiose. Estas sub- culturas em caldo BHI foram

transferidas para tubos contendo cinco mL de solução salina estéril a fim de se obter uma turbidez padrão referente à escala 0,5 de Mac Farland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL⁻¹.

Placas de Petri de 15x150 mm preparadas com ágar Mueller-Hinton foram escavadas em poços com 4 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Para os testes com *St. pyogenes*, placas de ágar Mueller-Hinton foram preparadas adicionando-se 5% de sangue de carneiro. A superfície de cada placa foi semeada com uma zaragatoa de algodão estéril embebida na suspensão padrão, tomando-se o cuidado de preservar as escavações sem semeadura. Após a semeadura, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para absorção do inóculo.

Utilizou-se seringas estéreis de 3 mL para o preenchimento dos poços com os diferentes géis. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por duas horas para que a substância pudesse ser absorvida pelo meio de cultura. Após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas para posterior avaliação da atividade antimicrobiana dos bioprodutos conforme metodologia anteriormente descrita.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Obtidos os dados, os mesmos foram submetidos a análise estatística, empregando-se o teste Kruskal-Wallis para comparação global, com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos, clorexidina 1%, clorexidina 2% e propilenoglicol estão representados nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Halos de inibição em mm dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos puros e controles positivos e negativo.

Substâncias	<i>P. aeruginosa</i> (27853)	<i>S. aureus</i> (25953)	<i>E. coli</i> (25922)	<i>St. pyogenes</i> (19615)	<i>E. faecalis</i> (29212)	<i>E. faecalis</i> (19433)
Clorexidina 1%	20	27	22	19	25	25
Clorexidina 2%	21	27	23	20	25	25
Propilenoglicol	0	0	0	0	0	0
Guaçatonga	0	0	0	14	0	0
Bardana	0	0	0	7	0	0
Própolis	0	0	13	13	0	0
Pariparoba	0	12	0	14	0	0
Óleo de alho	0	0	0	0	0	0
Alho hidroalcoólico	0	0	0	0	0	0
Aroeira-da-praia	0	11	0	0	10	10
Aroeira vermelha	0	11	0	0	10	9

Tabela 4. Halos de inibição em mm dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos e controles positivos em géis e controle negativo.

Substâncias	<i>P. aeruginosa</i> (27853)	<i>S. aureus</i> (25953)	<i>E. coli</i> (25922)	<i>St. pyogenes</i> (19615)	<i>E. faecalis</i> (29212)	<i>E. faecalis</i> (19433)
Clorexidina 1%	26	32	26	24	26	26
Clorexidina 2%	26	31	29	20	26	27
Propilenoglicol	0	0	0	0	0	0
Guaçatonga	0	0	0	0	0	0
Bardana	0	0	0	0	0	0
Própolis	0	0	8	10	0	0
Pariparoba	0	10	0	10	0	0
Óleo de alho	0	0	0	0	0	0
Alho hidroalcoólico	0	0	0	0	0	0
Aroeira-da-praia	0	8	0	0	8	8
Aroeira vermelha	0	8	0	0	8	8

Tabela 5. Halos de inibição em mm dos testes de sensibilidade bacteriana frente aos bioprodutos e controles positivos e negativo associados ao Ca(OH)_2 .

Substâncias	<i>P. aeruginosa</i> (27853)	<i>S. aureus</i> (25953)	<i>E. coli</i> (25922)	<i>St. pyogenes</i> (19615)	<i>E. faecalis</i> (29212)	<i>E. faecalis</i> (19433)
Clorexidina 1%	15	20	16	15	17	15
Clorexidina 2%	17	20	17	15	17	15
Propilenoglicol	10	10	9	0	9	9
Guaçatonga	10	10	9	0	9	9
Bardana	10	10	9	0	9	9
Própolis	10	10	9	0	9	9
Pariparoba	10	10	9	0	9	9
Óleo de alho	0	0	0	0	0	0
Alho hidroalcoólico	10	11	8	0	7	7
Aroeira-da-praia	10	10	9	0	9	9
Aroeira vermelha	10	10	9	0	9	9

A clorexidina, tanto a 1% como a 2%, mostrou grande atividade antibacteriana pura, na forma de gel e associada como veículo ao Ca(OH)_2 , estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Todas as pastas de Ca(OH)_2 revelaram efetividade contra todos os micro-organismos testados com exceção da pasta cujo veículo foi o óleo de alho. Frente ao *St. pyogenes*, somente as pastas de clorexidina 1% e 2% revelaram efetividade. Os extratos puros e os géis da aroeira-da-praia e aroeira vermelha revelaram efetividade contra *S. aureus* e contra as duas linhagens de *E. faecalis*. O extrato puro e gel da pariparoba demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e contra o *St. pyogenes*. O extrato da própolis revelou efetividade contra *E. coli* e *St. pyogenes*. As pastas de Ca(OH)_2 cujos veículos puros revelaram atividade antibacteriana, não foram potencializadas.

As figuras 1, 2, 3 e 4 mostram as placas dos testes de sensibilidade bacteriana.

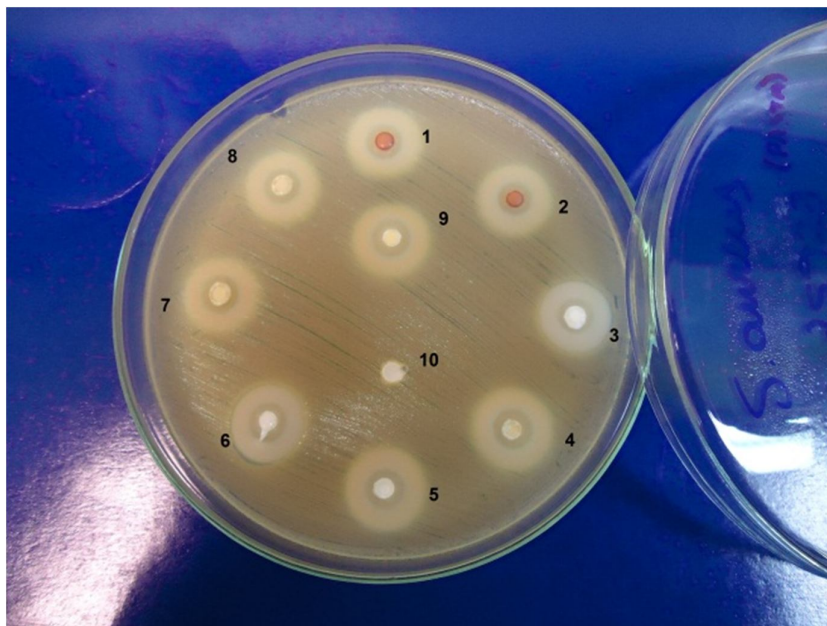


Figura 1. Padrão de sensibilidade do *S. aureus* (ATCC 25923) frente às pastas associadas aos bioprodutos.(1) aroeira-da-praia; (2) aroeira vermelha; (3) clorexidina em propilenoglicol 1%; (4) pariparoba; (5) propilenoglicol; (6) clorexidina 2%; (7) bardana; (8) guaçatonga; (9) própolis; (10) óleo de alho.

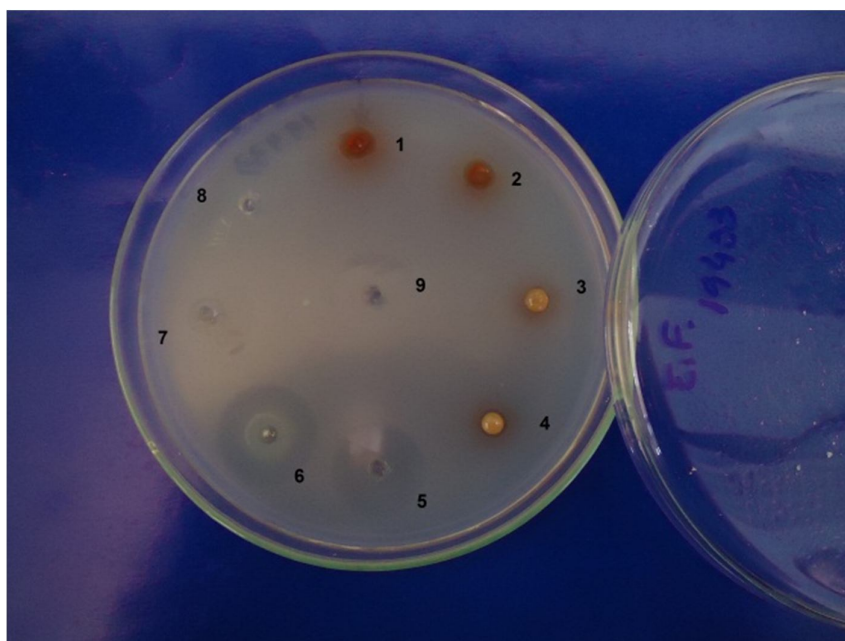


Figura 2. Padrão de sensibilidade do *E. faecalis* (ATCC 19433) frente a bioprodutos e géis.(1) aroeira-da-praia; (2) aroeira vermelha; (3) gel de aroeira-da-praia; (4) gel de aroeira vermelha; (5) clorexidina em propilenoglicol 2%; (6) gel de clorexidina 2%; (7) gel de clorexidina 1%; (8) propilenoglicol; (9) clorexidina em propilenoglicol 1%.

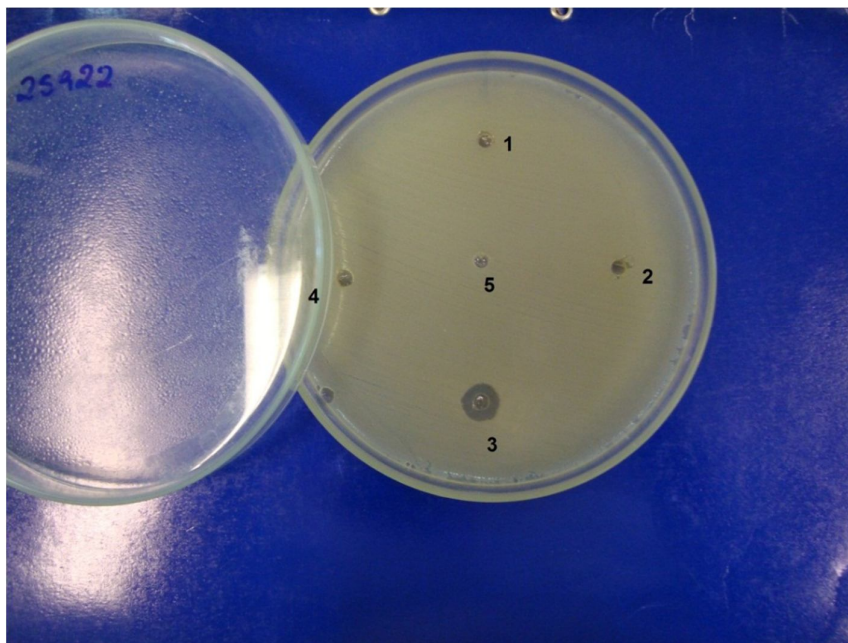


Figura 3. Padrão de sensibilidade da *E. coli* (ATCC 25922) frente ao extrato de própolis. (1) bardana; (2) guaçatonga; (3) própolis; (4) pariparoba; (5) óleo de alho.

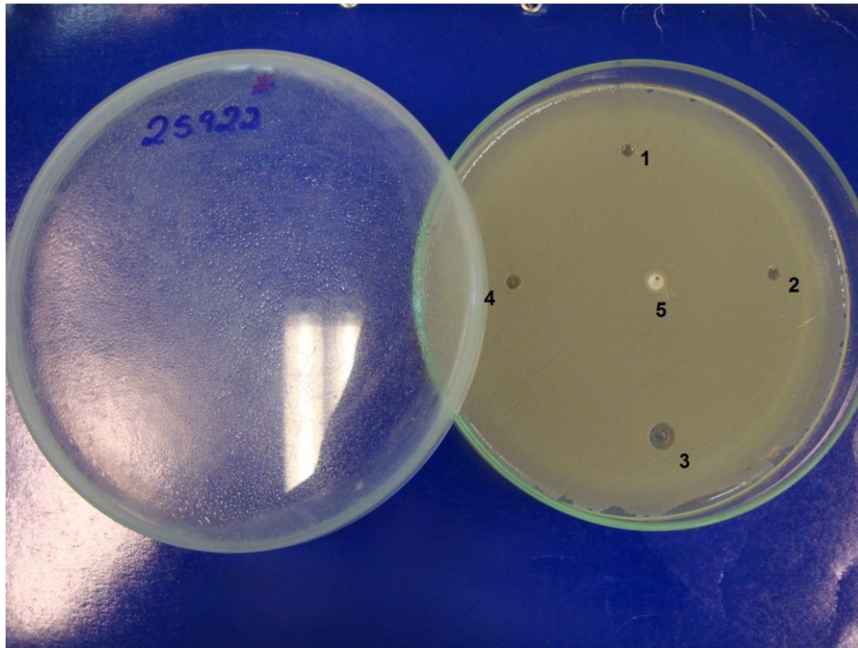


Figura 4. Padrão de sensibilidade da *E. coli* (ATCC 25922) frente ao gel de própolis (1) gel de bardana; (2) gel de guaçatonga; (3) gel de própolis; (4) gel de pariparoba; (5) gel de óleo de alho.

5 DISCUSSÃO

Através do método da difusão sobre a superfície de placas de ágar, foi avaliada a atividade antibacteriana de bioprodutos puros, na forma de géis e associados como veículos a pastas de Ca(OH)_2 frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. As substâncias clorexidina a 1% e 2% em propilenoglicol e o propilenoglicol puro, foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

A clorexidina, tanto a 1% como a 2%, mostrou grande atividade antibacteriana pura, na forma de gel e associada como veículo ao Ca(OH)_2 . Estes resultados corroboram alguns achados da literatura (EVANS et al., 2003; SIRÉN et al., 2004, SOUZA-FILHO et al., 2008). Os halos de inibição mostraram-se menores quando avaliamos a associação da clorexidina ao Ca(OH)_2 , resultados estes que também são pertinentes à literatura encontrada (SCHÄFER; BÖSSMANN, 2004; ERCAN et al., 2006).

Os extratos puros de guaçatonga, bardana, pariparoba e própolis revelaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus pyogenes*, sendo que a bardana mostrou o menor halo de inibição. Em se tratando de ser uma bactéria Gram positiva e, portanto, apresentando grande quantidade de peptidoglicano em nível de parede celular, estes resultados são semelhantes aos de Pereira et al., 2005, que demonstraram atividade antibacteriana da bardana frente ao *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e Gentil et al., 2006 que revelaram atividade do mesmo vegetal frente ao *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans*. Na forma de gel, somente os extratos da própolis e da pariparoba demonstraram atividade contra o *St. pyogenes*, com halos de inibição menores em relação aos extratos puros. Isto pode ter ocorrido devido à menor concentração dos extratos incorporada ao gel (gel a 10%).

Quando as pastas com veículos dos bioprodutos foram testadas frente ao *St. pyogenes*, não evidenciamos halos de inibição. Fica a hipótese de, por ter sido utilizado ágar sangue nos testes com *St. pyogenes*, por se tratar de um micro-organismo fastidioso, a matéria orgânica tenha dificultado a difusão das substâncias para o meio de cultura.

A *Escherichia coli* só foi inibida pelo extrato da própolis, sendo que na forma de gel, o halo de inibição foi menor. Todas as pastas, com exceção da de óleo de

alho como veículo, revelaram inibição da *E. coli*, provavelmente devido somente a ação do Ca(OH)_2 . Estes achados corroboram os de Rezende et al., 2008, que demonstraram a ação de pastas de Ca(OH)_2 associadas com extratos etanólico e não etanólico da própolis frente a culturas polimicrobianas.

Os extratos de pariparoba, aroeira-da-praia e aroeira vermelha revelaram atividade antibacteriana frente ao *S. aureus*, sendo que na forma de gel, os halos de inibição foram menores. A inibição de micro-organismo Gram positivo por extratos de aroeira-da-praia e aroeira-do-sertão também tem sido demonstrada na literatura (COSTA et al., 2010).

Frente aos extratos puros e géis dos bioprodutos, *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se altamente resistente. Frente as pastas de Ca(OH)_2 , com exceção daquela cujo veículo foi o óleo de alho, este micro-organismo mostrou-se sensível, provavelmente devido somente a ação do Ca(OH)_2 .

O extrato hidroalcoólico e o óleo de alho, puros e na forma dos géis, não demonstraram atividade antibacteriana. Nossos achados não corroboram os de Fani et al., 2007 que revelaram inibição do *Streptococcus mutans* frente ao extrato de alho e nem aos de Borhan-Mojabiet et al., 2012 que, pelo teste de contato direto com a saliva de pacientes, mostrou efetiva redução da microbiota oral pelo extrato hidroalcoólico de alho. As pastas de Ca(OH)_2 com extrato hidroalcoólico revelaram atividade antibacteriana. Avaliamos a hipótese de que o fato do óleo de alho puro e em gel, como veículo das pastas, não ter demonstrado atividade antimicrobiana, se dá pela dificuldade e demora de liberação dos íons hidroxila da pasta, já que o óleo é apolar e do princípio ativo presente no mesmo. Futuros estudos poderão revelar qual a melhor forma de extração dos princípios ativos deste vegetal.

As duas linhagens ATCC de *E. faecalis*, ATCC 29212 e ATCC 19433, foram inibidas pelos extratos puros e na forma de gel da aroeira-da-praia e aroeira vermelha, sendo os menores halos na forma de gel. Estes resultados também foram revelados por Costa et al., 2010, utilizando a linhagem ATCC 29212 para os extratos de aroeira-da-praia e aroeira-do-sertão. Frente todas as pastas, com exceção daquela preparada com óleo de alho, o micro-organismo mostrou-se sensível.

Weckwerth et al., 2008 e Weckwerth et al., 2011, revelaram atividade antimicrobiana de pastas de Ca(OH)_2 associadas a extratos de guaçatonga, frente a linhagens de campo de *E. faecalis* pelos métodos da difusão e do contato direto. Estes achados não foram confirmados na presente pesquisa, talvez pelo fato de os

pesquisadores terem utilizados outros tipos de extratos e não o de natureza hidroalcoólico.

O presente estudo comparou a sensibilidade de duas linhagens de *E. faecalis* frente aos bioprodutos puros, na forma de gel e associados às pastas de Ca(OH)_2 . Este é um micro-organismo que se apresenta na forma de coco Gram positivo, com elevada resistência ao Ca(OH)_2 , responsável por casos de insucesso endodôntico (SUNDQVIST et al., 1998; ROÇAS et al., 2004).

E. faecalis resiste ao efeito antibacteriano *in vitro* do Ca(OH)_2 (Weiger et al., 1995) e esta resistência está relacionada a uma bomba de prótons (EVANS, et al., 2002).

Em endodontia, as pastas de Ca(OH)_2 com diferentes veículos, têm sido utilizadas nos casos de pulpotomias, tratamento de perfurações radiculares e como medicação intracanal (FAVA et al., 1999; ESTRELA, et al., 2001).

Assim, na presente pesquisa, focada ao emprego de produtos naturais na terapia endodôntica, não pudemos revelar a potencialização das pastas de Ca(OH)_2 pelos bioprodutos puros, que revelaram atividade antibacteriana contra algumas das linhagens estudadas. Também, fica evidente que, com exceção do óleo de alho, as substâncias não interferiram drasticamente com a liberação dos íons cálcio, conforme já demonstrado na literatura (Duarte et al., 2009) sendo que todas as pastas demonstraram atividade antibacteriana.

Futuras pesquisas, com diferentes metodologias, são necessárias para elucidar um bioproduto que possa efetivamente potencializar a pasta de Ca(OH)_2 em sua atividade antibacteriana na prática endodôntica.

6 CONCLUSÃO

Avaliando-se os resultados obtidos pela metodologia empregada na presente pesquisa, podemos concluir que:

- a) Clorexidina a 1 e 2% pura, na forma de gel e associada a pasta de Ca(OH)_2 apresenta boa atividade antibacteriana frente à linhagens Gram positivas e Gram negativas;
- b) Extratos puros de guaçatonga, bardana, pariparoba e própolis demonstram atividade antibacteriana contra *St. pyogenes*;
- c) *E. coli* apresenta sensibilidade frente ao extrato da própolis;
- d) *S. aureus* e linhagens ATCC 29212 e ATCC 19433 de *E. faecalis* apresentam sensibilidade frente aos extratos de aroeira-da-praia e aroeira vermelha;
- e) *P. aeruginosa* demonstra grande resistência aos bioprodutos testados;
- f) Óleo de alho não tem atividade antibacteriana contra as linhagens testadas;
- g) Pastas de Ca(OH)_2 associadas à bioprodutos, com exceção do óleo de alho, apresentam boa atividade antibacteriana contra Gram positivas e Gram negativas.

REFERÊNCIAS

- BORHAN-MOJABI, K. et al, H. Efficacy of different concentrations of garlic extract in reduction of oral salivary microorganisms. **Arch. Iran. Med.**, v. 15, n. 2, p. 99-101, 2012.
- COSTA, E. M. M et al. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, V. 46, N. 3, P. 175-180, 2010.
- CUTLER, R. R. et al. *In vitro* activity of an aqueous allicin extract and a novel allicin topical gel formulation against Lancefield group B streptococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 63, p. 151-154, 2009.
- CWIKLA, S. J. et al. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. **J. Endod.**, V. 31, N. 1, P. 50-52, 2004.
- DUARTE, M. A. H. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. **J. Endod.**, v. 35, n. 9, p. 1274-1277, 2009.
- ERCAN,E.; DALLI, M.; DÜLGERGIL, Ç. T. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 102, n. 2, p. 27-31, 2006.
- ESTRELA, C. et al. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 341-345, 2001.
- ESTRELA, C. et al. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 14, n. 1, p. 33-37, 2006.
- ESTRELA, C.; et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. **Braz. Dent. J.**,v. 10, p. 63-72, 1999.
- ESTRELA, C.; PESCE, H. F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. **Braz. Dent. J.**, v. 7, n. 1, p. 41-46, 1995.
- ESTRELA, C.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y.; BAUMMANN, L. L. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J. Endod.**, v. 24, p. 15-17, 1998.
- ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BMMANN, L. L.; FELIPPE Jr., O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz. Dent. J.**, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.
- EVANS, M. D. et al. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J. Endod.**, v. 29, n. 5, p. 338-339, 2003.

EVANS, M.D. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 221-228, 2002.

FANI, M. M.; KOHANTEB, J.; DAYAGHI, M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. **J. Indian Soc. Pedod. Prevent Dent.**, v. 24, p. 164-168, 2007.

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **Int. Endod. J.**, v. 32, p. 267-282, 1999.

GENTIL, M. et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressing. **Phytother. Res.**, v. 20, p. 184-186, 2006.

GOMES, B. P. F. de A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. **Braz. Dent. J.**, v. 13, n. 3, p. 155-161, 2002.

JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 632-637, 2007.

KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KONTAKIOTIS, G.; NAKOU, M.; GEORGOPOULOU, M. *In vitro* studies of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int. Endod. J.**, v. 28, p. 285-289, 1995.

McHUGH, C. P. et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis in vitro*. **J. Endod.**, v. 30, n. 4, p. 218-219, 2004.

PACIOS, M. G. et al. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. **J. Oral Sci.** v. 46, n. 2, p. 107-111, 2004.

PAVASKAR, R. et al. An *in vitro* study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide- and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v. 38, n. 1, p. 95-100, 2012.

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

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v.36, p.1-11, 2003.

REZENDE, G. P. da S. R. de et al. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. **Braz. Dent. J.**, v. 19, n. 4, p. 301-305, 2008.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

SABER, S. E. M.; EL-HADY, S. A. Development of naintracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; *an in vitro* study. **Eur. J. Dent.**, v. 6, p. 43-50, 2012.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J. Endod.**, v. 20, p.127-129, 1994.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod.**, v. 17, p. 76-78, 1993.

SCHÄFER, E.; BÖSSMANN, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v. 31, n. 1, p. 53-56, 2004.

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

SIQUEIRA Jr., J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int. Endod. J.**, v. 32, p. 361-369, 1999.

SIRÉN, E. K. et al. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 112, p. 326-331, 2004.

SOARES, J. A. et al. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated P-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 1, p. 8-15, 2007.

SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.

SOUZA-FILHO, F. J. de et al. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Braz. Dent. J.**, v. 19, n. 1, p. 28-33, 2008.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

TANOMARU, J. M. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int. Endod. J.**, v. 36, p. 733-739, 2003.

VIANNA, M. E. et al. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. **Braz. Dent. J.**, v. 16, n. 3, p. 175-180, 2005.

WECKWERTH, P. H. et al. Comparação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes antibióticos e extratos hidroalcoólicos e infusão de *Casearia sylvestris* Swart (guaçatonga) frente a linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral. **Salusvita**, v. 27, n. 2, p. 259- 274, 2008.

WECKWERTH, P. H. et al. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide associated with different substances against *Enterococcus faecalis* strains. **Dental Press Endod.**, v. 1, n. 1, p. 46-51, 2011.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 11, p. 15-19, 1995.

ANEXOS

ANEXO A- Laudo técnico e identificativo da planta *Piper umbellatum* elaborado pela Santos Flora



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
Rua Tuiuti, 718/720 - CEP 03081-015
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 2091-8787 - Fax: +55 11 2091-6387

Controle de Qualidade Laudo Técnico e Identificativo

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
www.santosflora.com.br

Registro IBAMA: 35867
CMVS: 355030801-109-000092-1-0
Autorização ANVISA: 6.02.671-1
Registro CRF: 20505
Data: 18/8/2011

NOMENCLATURA:

PARIPAROBA

Nome científico (gênero/espécie):	<i>Piper umbellatum</i> - L.	Esterilização:	Não Houve
Identificação botânica:	<i>Piper umbellatum</i> - L.	Família:	Piperaceae
Parte utilizada:	Folha e talo	Origem:	Brasil
Manufatura/Val (mês/ano):	03/2011 - 03/2014	Lote:	PARI01/0311
Método de secagem:	Estufa		

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:

Folhas grandes de coloração verde escura, arredondadas, cordiformes e aromáticas. Talos apresentando nós. Microscopia: células oleíferas, mesófilo heterogêneo assimétrico, pêlo tector unisseriado com cutícula estriada. Odor aromático leve e sabor característico. Característica do pó: higroscópico de coloração pardo esverdeado.

Teste de pureza e integridade:

Umidade: 13,06% (esp. máx. 17%); Cinzas Totais: 9,08% (esp. máx. 18%); Matéria-esmagada: 1,98% (máx.: 2,0%).

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

Teste para Flavonóides: Positivo.
Teor de Flavonóide: 0,47% (esp. mín. 0,01%)

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem total	Máx. 10.000 UFC/g	N.R.
Bolores e leveduras	Máx. 1.000 UFC/g	N.R.
Enterobactérias	Ausência/g	N.R.
<i>E. coli</i>	Ausência/10g	N.R.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência/g	N.R.
<i>Pseudomonas sp</i>	Ausência/g	N.R.
<i>Salmonella sp</i>	Ausência/10g	N.R.

Observações:

- * Armazenamento em local seco e ventilado, sem umidade e calor;
- * Mudança de cor pode ocorrer devido ao fato de que o produto é de origem natural ou vegetal;
- * Nós não somos responsáveis quando os produtos são manipulados e / ou utilizado de forma contrária aos padrões.
- * Ensaio complementar, como microbiologia, podem ser realizados com custos adicionais.
- * NR refere-se a análise não realizada.
- * A validade será desconsiderada caso o produto seja manipulado ou armazenado em locais inadequados.
- * Esterilização sob consulta.

L.002

REFERÊNCIAS: Análise de cor, Sensorial, Cinzas, Farmacopéia Brasileira V ed.
Flavonóides, Aspecto, Elementos estranhos: Metodologia Interna.


Fernanda Baffa
FARMACÉUTICA RESPONSÁVEL
CRF/SP: 37.983



ANEXO B- Laudo de análise da planta *Arctium lappa* elaborado pela Santos Flora



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
Rua Tuiuti, 718/720 - CEP: 03081-015 - São Paulo - SP - Brasil
Fone: +55 11 2091-8787 - Fax: +55 11 2091-6387
www.santosflora.com.br - santosflora@santosflora.com.br
CNPJ 51.569.309/0001-38 - I.E. 110.316.429.113

Controle de Qualidade Laudo de Análise

Registro IBAMA: 35867
Licença de Funcionamento: 355030801-109-00092-1-0
Autorização ANVISA: 6.02.671-1
Registro CRF: 20505
Data: 24/10/2011

Nomenclatura: **BARDANA FOLHAS**
Nome científico: *Arctium lappa* - L.
Parte utilizada: Folhas
Manufatura/Validade (mês/ano): 09/2011 - 09/2014
Método de secagem: À sombra

Data de Colheita (mês/ano): 09/2011
Esterilização: Não Houve
Família: Asteraceae
Origem: Brasil
Lote: BARD01/0911

Características organolépticas:
Folhas pecioladas, cordiformes e ovadas, a face inferior é tomentosa; de cor esbranquiçada e a superior de cor verde. Apresenta mesófilo heterogêneo e predomínio de tricomas na epiderme inferior. Sabor e odor característicos.

Umidade: 10,05% (*esp. máx. 14%); Cinzas Totais: 11,55% (*esp. máx. 18%); Elementos estranhos: ausente (*esp. máx. 2,0%).
Análises Físico - Químicas:

Teor de flavonóides: 0,21% (esp. min. 0,10%)

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:
* Especificação interna.
L: 001

• É DE RESPONSABILIDADE DO CLIENTE EFETUAR A DESCONTAMINAÇÃO E DEMAIS ANÁLISES DESSE PRODUTO, POR NÃO TEREM SIDO SOLICITADAS POR OCASIÃO DO PEDIDO DE COMPRA;
• POR SE TRATAR DE UM PRODUTO DE ORIGEM VEGETAL, PODERÃO OCORRER LEVES VARIAÇÕES EM SUA COR, ODOR E SABOR;
• PARA GARANTIR A QUALIDADE E A VALIDADE DESTES PRODUTOS, ARMAZENE-O EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DO CALOR E UMIDADE;
• NÃO REALIZAMOS ANÁLISE MICROSCÓPICA.

Fernanda Buffa
Farmacêutico(a) Responsável
FERNANDA BAFFA
CRF/SP: 37.983

ANEXO C- Laudo de análise da planta *Casearia sylvestris* elaborado pela Santos Flora



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
Rua Tuiuti, 718/720 - CEP 03081-015 - São Paulo - SP - Brasil
Fone: +55 11 2091-8787 - Fax: +55 11 2091-6387
www.santosflora.com.br - santosflora@santosflora.com.br
CNPJ 51.569.309/0001-38 - I.E. 110.316.429.113

Controle de Qualidade

Laudo de Análise

Registro IBAMA: 35897
Licença de Funcionamento: 355030801-199-00032-1-0
Autorização ANVISA: 6.02.671-1
Registro CRF: 20505
Data: 06/03/2012

Nomenclatura: **GUACATONGA**
Nome científico: *Casearia sylvestris*
Parte utilizada: Talo e Folhas Secas
Manufatura/Validade (mês/ano): 01/10/2011 - 01/10/2013
Método de secagem: Estufa

Data de Colheita (mês/ano): 01/10/2011
Esterilização: Não Houve
Família: Flacourtiaceae
Origem: Brasil
Lote: GUAS01/1011

Características organolépticas:

Folhas de margem serrado-denteadas, lanceoladas, ovaladas e elípticas, agudas até longo-acuminadas no ápice, estreitas e arredondadas na base. De cor verde-escuro brilhante, contra a luz mostram minúsculos pontos translúcidos, que correspondem às glândulas de óleo essencial. São inúmeras as variações no aspecto das folhas da guacatonga. Pó higroscópico de coloração pardo esverdeada. Sabor e odor característicos.

Análises Físico - Químicas:

Umidade: 11,0% (*esp. máx. 11%); Cinzas Totais: 7,94% (*esp. máx. 9,0%); Elementos estranhos: Ausente (*esp. máx. 2,0%)

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

Teor de Taninos: 1,3% (*esp. mín. 1,3%); Teor de óleo essencial: 0,49% (*esp. mín. 0,2%).

* Especificação Interna.

* É DE RESPONSABILIDADE DO CLIENTE EFETUAR A DESCONTAMINAÇÃO E DE MAIS ANÁLISES DESSE PRODUTO, POR NÃO TERMOS ACESSO ÀS CONDIÇÕES DE MANEIRA DE CULTIVO, COLHEITA, PROCESSAMENTO, EMBALAGEM, E MANEIRA DE ARMAZENAMENTO DO PRODUTO. POR CASO DO PEDIDO DE COMPRA, PODERÃO OCORRER LEVES VARIAÇÕES EM SUA CCT, ODOR E SABOR. NÃO GARANTIMOS A QUALIDADE E A VALIDADE DESSE PRODUTO, ARMAZENE-O EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DO CALOR E DA UMIDADE. NÃO REALIZAMOS ANÁLISE MICROSCÓPICA.

Cópia

Informativa

CRF/SP: 37.883

ANEXO D- Laudo de análise da planta *Schinus terebinthifolius* elaborado pela Santos Flora



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
 Rua Tuiuti, 718/720 - CEP 03081-015 - São Paulo - SP - Brasil
 Fone: +55 11 2091-8787 - Fax: +55 11 2091-6387
 www.santosflora.com.br - santosflora@santosflora.com.br
 CNPJ 51.569.309/0001-38 - I.E. 110.316.429.113

Controle de Qualidade

Laudo de Análise

Registro IBAMA: 35867
 Licença de Funcionamento: 355030801-109-00092-1-0
 Autorização ANVISA: 6.02.671-1
 Registro CRF: 20505
 Data: 18/09/2012

Nomenclatura: AROEIRA RASURADA
Nome Científico: *Schinus terebinthifolius* Rad.
Parte Utilizada: Casca
Manufatura/Validade (mês/ano): 27/08/2012 - 27/08/2015
Método de Secagem: Ao sol

Data da Colheita (mês/ano): 08/2012
Esterilização: Não Houve
Família: Anacardiaceae
Origem: Brasil
Lote: AROER01/0812

Características Organolépticas:

Casca de coloração pardo acinzentado a marrom amarelado, sabor e odor característico.

Análises Físico - Químicas:

Umidade: 11,61% (esp. máx. 15%); Cinzas Totais: 8,05% (esp. máx. 10,5%); Elementos estranhos: Ausente (esp. máx. 2%).

Análise de Princípios Ativos e ou Marcadores:

Teor de Taninos: 5,08% (esp. mín. 0,1%)

REFERÊNCIAS: Metodologia Interna

Cópia

Informativa

- É DE RESPONSABILIDADE DO CLIENTE EFETUAR A DESCONTAMINAÇÃO E DEMAIS ANÁLISES DESSE PRODUTO, POR NÃO TEREM SIDO SOLICITADAS POR OCASIÃO DO PEDIDO DE COMPRA;
- POR SE TRATAR DE UM PRODUTO DE ORIGEM VEGETAL, PODERÃO OCORRER LEVES VARIACÕES EM SUA COR, ODORE E SABOR;
- PARA GARANTIR A QUALIDADE E A VALIDADE DESTES PRODUTOS, ARMAZENE-O EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DO CALOR E UMIDADE;
- NÃO REALIZAMOS ANÁLISE MICROSCÓPICA.

Fernanda Baffa
Farmacêutico(a) Responsável
FERNANDA BAFFA
CRF/SP: 37.983

**ANEXO E- Certificado de análise da planta *Myracrodruom urundeuva*
elaborado pela Max Pharma**



CERTIFICADO DE ANÁLISE

AROEIRA - PÓ *1 kg*

12 0 SET. 2012

ORIGEM:	Brasil	
MANUFATURA:	01/2008	VAL: 01/2013
LOTE:	015	
LOTE INTERNO:	6780	
MÉTODO DE SECAGEM:	Ao sol	
PARTE UTILIZADA:	Casca	
NOME CIENTIFICO:	<i>Myracrodruom urundeuva fr. all.</i>	

Aspecto macroscópico:

A casca apresenta superfície externa de cor pardo-acinzentada, rugosa, com algumas manchas claras e presença de placas de líquens. A face interna é de cor pardo-avermelhada.

Aspecto microscópico:

O periderme externo do retidoma apresenta súber bastante desenvolvido e o periderme interno apresenta células parenquimáticas e grupos de fibras entrecruzadas (F.B.).

Odor e sabor:

Característicos.

HIGROSCÓPICO

Referência: Laudo do fabricante, Farmacopéia Brasileira 4ª Ed.
É de responsabilidade do cliente efetuar esterilização deste produto antes do seu consumo, caso a mesma não conste neste laudo.

Dra. Regiane C. Firmino
CRF: 31.547-SP
Farmacêutica Responsável

**CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTÃO EM CONFORMIDADE COM
AQUELES RECEBIDOS DO NOSSO FORNECEDOR**

MAX PHARMA COM. E IMP. DE INSUMOS FARMAC. LTDA.
Rua Atica nº 150- Brooklin Pta - São Paulo - SP cep: 04834-040
Telefone/Fax: (11) 5031-0288

**ANEXO F- Certificado de análises das cápsulas de óleo de alho elaborado pela
Valdequímica**



VALDEQUÍMICA
Produtos Químicos Ltda.

cap. Óleo de Alho 250g 1 mil

08 SET. 2011

PRODUTO: CAPSULA DE OLEO DE ALHO - 250 MG	PAG.: 1
LOTE FABRICANTE: 11060365C	06/09/2011
LOTE INTERNO: 021332	FABRICACAO: 01/06/2011
FABRICANTE: SOFTCAPS	VALIDADE: 01/06/2013
ORIGEM: NACIONAL	EXPORT/FUR: SOFTCAPS
NOTA FISCAL: 55908	PROCEDENCIA: NACIONAL
	QTD: 1,000

CLIENTE: FUNDACAO MERITAS

TESTE	ESPECIFICACAO	RESULTADO
DESCRICAO DA CAPSULA	CAPSULA MOLE DE DELATINA	
DESCRICAO DO CONTEUDO	MOLE DE 05 OVAL, COR NATURAL	CONFORME
	CONTIDO OLEOSO DE COLORACAO	
	AMARELO CLARO, ODOR CARACTE-	
	RISTICO E LIVRE DE MATERIAL	CONFORME
PESO BRUTO	CONFORME ESPECIFICACAO	368,6mg/caps
PESO DO CONTEUDO	225-275 mg/caps	246,50mg/caps
DESVIO PADRAO RELATIVO	MAX. 6,0%	0,6%
DESINTEGRACAO	MAX. 45 min.	
MICROBIOLOGIA		
C. TOTAL	MAX. 1000 UFC/g	<10 UFC/g
MOLES E LEVEDURAS	MAX. 100 UFC/g	<10 UFC/g
E. COLI	AUSENTE	AUSENTE
S. AUREUS	AUSENTE	AUSENTE
P. AERUGINOSA	AUSENTE	AUSENTE
SALMONELLA SP	AUSENTE	AUSENTE

REFERENCIA ANALITICA: METODOLOGIA DO FABRICANTE.

o RESULTADO OBTIDO EM ANALISES REALIZADAS NO LABORATORIO DE CONTROLE DE QUALIDADE VALDEQUÍMICA, CONFORME ESPECIFICACAO QUINTA NO LAUDO, E REFERENCIA FORNECIDA PELO FABRICANTE. AS DENAIS FORAM TRANSMITIDAS CONFORME LAUDO ORIGINAL.

o LAUDO VALIDO E APRESENTACAO DA NOTA FISCAL. CONTEUDOS DE ANÁLISES CONSULTAR INFORMACOES CONTIDAS NO ROTULO DO INSUMO.

* EM CASO DE DUVIDA, ENTRE EM CONTATO COM NOSSO DEPTO. TECNICO (TEL) 3721-6407

CS
CARLOS A. ESTEVES
FARMACEUTICO
CRF 32523

JJ
JULIANO NUNES JOAQUIM
FARM. RESPONSÁVEL
CRF 26301

BB
BETINA NOBREIRA BEZERRA
TÉCNICA
CRF 0458026

KS
KARINA L. SANTOS
FARMACEUTICA
CRF 53307

TS
THAIS S. TAKADACHI
FARMACEUTICA
CRF 53509

Autorização de Funcionamento Nº 1.00962.2

Autorização Especial de Funcionamento Nº 1.20266

Rua dos Três Irmãos, 212/218 - Bairro Caxingui - São Paulo - SP - Brasil - CEP 05615-190

Tel.: 55 11 3721-6407 - Fax: 55 11 3721-6376 - Televendas: 0800-7046407

Site: www.valdequimica.com.br - E-mail: valdequimica@valdequimica.com.br

**ANEXO G- Certificado de análises do extrato de própolis elaborado pela
Purifarma**

Ext. Propolis

18 FEV. 2011

CERTIFICADO DE ANALISE

PRODUTO...: EXT. GLICOLICO PROPOLIS
FABRIC...: 30/10/09 PROCED...: BRASIL EMISSAO...: 16/02/11
VALIDADE...: 30/10/12 ORIGEM...: BRASIL N.FISCAL...: 030387
LOTE FAB/INTERNO.: PROD010542

NOME DO PRODUTO: EXTRATO GLICOLICO PROPOLIS (Propolis wax)
CAS: N.D.
FABRICANTE: MAPRIC
FORM. MOLECULAR: N.D.
PESO MOLECULAR: N.D.
TIPO: COSMETICO
APLICACAO: CICATRIZANTE, ANTI-INFLAMATORIO

RESULTADO DA ANALISE: B.A. 1309/10 OF:18.528/10

TESTES	ESPECIFICACAO	RESULTADOS
ASPECTO FISICO:	LIQUIDO LIMPIDO, CASTANHO A CASTANHO AMARELADO, COM ODOR CARACTERISTICO.	DE ACORDO
pH (SOL. 10%):	3.5 A 5.5	4.43
SOLUBILIDADE:	SOLUVEL EM PROPILENOGLICOL, ETANOL, SORBITOL E GLICERINA, SOFRE TURVACAO EM AGUA.	DE ACORDO
DENSIDADE:	0.90 A 1.00	0.918
ANALISE MICROBIOLOGIA		
BACTERIAS TOTAIS:	< 100 UFC/G	DE ACORDO
FUNGOS E LEVEDURAS:	< 100 UFC/G	DE ACORDO
COLIFORMES TOTAIS:	AUSENTE	DE ACORDO
COLIFORMES FECALIS:	AUSENTE	DE ACORDO

OBS.: DADOS RESULTANTES DE AVALIACAO ANALITICA REALIZADA PELO FABRICANTE/
FORNECEDOR.
ESTE INSUMO FOI DISTRIBUIDO PELA PURIFARMA NA EMBALAGEM ORIGINAL DO
FABRICANTE / FORNECEDOR.
PODERA HAVER ALTERACAO DE COR POR MODIFICACAO DOS COMPONENTES COLORIDOS
DA PLANTA OU DE ACORDO COM A SAFRA/LOTE UTILIZADO.
PARTE DA PLANTA UTILIZADA: SUBSTANCIA RESINOSA

RESULTADO: APROVADO

Flavio D. Morelli
FARM. RESP. CRF-SP N° 24.285



Purifarma

Escritório e Vendas - Rua Cel. Cabrita, 131 - CEP 01545-030 - Jd. da Glória - Fone: (11) 2067-5600 - Fax: (11) 2215-8823 - S. Paulo - DDG: 0800-10-5008

Laboratório - Rua Cel. Cabrita, 75 / 83 / 85 / 95 - CEP 01545-030 - Jd. da Glória - SAC: 0800-7715008 - S. Paulo

www.purifarma.com.br

purifarma@purifarma.com.br

ANEXO H- Laudo de identificação bacteriana da cepa ATCC 29212 realizado pela PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)



PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC

• Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a NBR ISO 9001/2008 •

Provedor de Ensino de Proficiência nas áreas de Laboratórios Clínicos, Banco de Sangue e Organizações de Diagnóstico "in vitro" e Alimentos

PREZADO(A) ASSOCIADO(A),

VIMOS ATRAVÉS DESTA INFORMAR, PARA SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO, O ESTUDO BIOQUÍMICO DA BACTÉRIA DO LOTE 0325

Bactéria : *Enterococcus faecalis* (ATCC 29 212)

Arginina	+
Arabinose	-
Bacitracina	Resistente
Bile Esculina	+
Catalase	-
Crescimento em NaCl	+
Cristal Violeta	+
Fosfatase	+
Hemólise	Gama
Inusitol	-
Lactose	+
Manitol	+

Manose	+
Novobiocina	Resistente
Optoquina	Resistente
PYR	+
Rafinose	-
Redução de Nitrato	-
Ribose	+
Sorbitol	+
Trealose	+
Urease	-
VP	+

PROVAS BIOQUÍMICAS CONFIRMADAS NO MICROSCAN (DADE) E MEIOS DE CULTURA PREPARADOS NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ.

ANEXO I- Laudo de identificação bacteriana da cepa ATCC 19433 realizado pela PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)



PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC

• Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a NBR ISO 9001:2000 •

Provedor de Serviços de Proficiência nas áreas de Laboratórios Clínicos, Bancos de Sangue e Organizações de Diagnóstico "In vitro" e Alimentos

PREZADO(A) ASSOCIADO(A),

VIMOS ATRAVÉS DESTA INFORMAR, PARA SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO, O ESTUDO BIOQUÍMICO DA BACTÉRIA DO LOTE 296

Bactéria : ***Enterococcus faecalis* (ATCC 19 433)** sp

Arginina	+
Arabinose	-
Bacitracina	Resistente
Bile Esculina	+
Catalase	-
Crescimento em NaCl	+
Cristal Violeta	+
Fosfatase	+
Hemólise	Gama
Inusitol	-
Lactose	+
Manitol	+

Manose	+
Novobiocina	Resistente
Optoquina	Resistente
PYR	+
Rafinose	-
Redução de Nitrato	-
Ribose	+
Sorbitol	+
Trealose	+
Urease	-
VP	+

PROVAS BIOQUÍMICAS CONFIRMADAS NO MICROSCAN (DADE) E MEIOS DE CULTURA PREPARADOS NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ.

CORDIALMENTE,

DR. ESTEVÃO JOSÉ COLNAGO
ASSESSOR RESPONSÁVEL - MICROBIOLOGIA

ANEXO J- Laudo de identificação bacteriana da cepa ATCC 19615 realizado pela PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)



Programa Nacional de Controle de Qualidade
Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Provedor de serviços de Proficiência para Laboratórios Clínicos, Bancos de Sangue, Organizações de Diagnóstico *in vitro* e Alimentos

Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a NBR ISO 15189

PREZADO(A) ASSOCIADO(A),

VIMOS ATRAVÉS DESTA INFORMAR, PARA SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO, O ESTUDO BIOQUÍMICO DA BACTÉRIA DO LOTE 0328

Bactéria : *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico do grupo A) ATCC 19 615

Arginina	+	Manose	+
Arabinose	-	Novobiocina	sensível
Bacitracina	sensível	Optoquina	resistente
Bile Esculina	-	PYR	+
Catalase	-	Rafinose	-
Crescimento em NaCl	-	Redução de Nitrato	-
Fosfatase	+	Ribose	-
Hemólise	-	Sorbitol	-
Inositol	-	Trealose	+
Lactose	+	Urease	-
Manitol	-	VP	-

PROVAS BIOQUÍMICAS CONFIRMADAS NO MICROSCAN (DADE) E MEIOS DE CULTURA PREPARADOS NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE – PNCQ.

CORDIALMENTE,

DR. ESTEVÃO JOSÉ COLNAGO
ASSESSOR RESPONSÁVEL - MICROBIOLOGIA

**ANEXO K- Laudo de identificação bacteriana da cepa ATCC 27853 realizado
pela PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)**



Programa Nacional de Controle de Qualidade
Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Provedor de ensaios de Proficiência
para Laboratórios Clínicos,
Bancos de Sangue, Organizações
de Diagnóstico *in vitro* e Alimentos

Empresa certificada pela ABNT
em conformidade com a NBR ISO 9001:2000

PREZADO(A) ASSOCIADO(A),

VIMOS ATRAVÉS DESTA INFORMAR, PARA SUA AVALIAÇÃO E
COMPARAÇÃO, O ESTUDO BIOQUÍMICO DA BACTÉRIA DO LOTE 0310

Bactéria : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27 853

ADONITOL	-	MOBILIDADE	+
ARGININA	+	NITRATO	+
CITRATO	+	ORNITINA	-
OF/GLICOSE	+	ONPG	-
GLICOSE	-	OXIDASE	+
H ₂ S	-	RAFINOSE	-
HIDRÓLISE DA ESCULINA	-	RAMINOSE	-
INDOL	-	SACAROSE	-
INOSITOL	-	SORBITOL	-
LISINA	-	TRIPTOFANO DESAMINASE	-
MALONATO	+	URÉIA	-
MELOBIOSE	-	VP	-

PROVAS BIOQUÍMICAS CONFIRMADAS NO MICROSCAN (DADE) E MEIOS
DE CULTURA PREPARADOS NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE
QUALIDADE – PNCQ.

CORDIALMENTE,

DR. ESTEVÃO JOSÉ COLNAGO
ASSESSOR RESPONSÁVEL - MICROBIOLOGIA

**ANEXO L- Laudo de identificação bacteriana da cepa ATCC 25923 realizado
pela PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)**



PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC

* Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a NBR ISO 9001:2000 *

Provedor de Ensaios de Proficiência nas áreas de Laboratórios Clínicos, Bancos de Sangue e Organizações de Diagnóstico "in vitro" e Alimentos

PREZADO(A) ASSOCIADO(A),

VIMOS ATRAVÉS DESTA INFORMAR, PARA SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO, O ESTUDO BIOQUÍMICO DA BACTÉRIA DO LOTE 0305

Bactéria : *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 OK

Arginina	+	Novobiocina	Sensível
Bile Esculina	-	Optoquina	Resistente
Catalase	+	PYR	-
Coagulase	+	Rafinose	-
Dextrose	+	Redução de Nitrato	+
Fosfatase	+	Sacarose	+
Lactose	+	Trealose	+
Manitol	+	Urease	+
Manose	+	VP	+
Melbiose	-	Xylose	-

PROVAS BIOQUÍMICAS CONFIRMADAS NO MICROSCAN (DADE) E MEIOS DE CULTURA PREPARADOS NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ.

CORDIALMENTE,

DR. ESTEVÃO JOSÉ COLNAGO
ASSESSOR RESPONSÁVEL - MICROBIOLOGIA

**ANEXO M- Laudo de identificação bacteriana da cepa ATCC 25922 realizado
pela PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)**



PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE - PNCQ

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC

• Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a NBR ISO 9001/2008 •

Provedor de Serviços de Proficiência nas áreas de Laboratórios Clínicos, Banco de Sangue e Organizações de Diagnóstico "in vitro" e Alimentos

PREZADO(A) ASSOCIADO(A),

VIMOS ATRAVÉS DESTA INFORMAR, PARA SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO, O ESTUDO BIOQUÍMICO DA BACTÉRIA DO LOTE 0317

Bactéria : *Escherichia coli* (ATCC 25922)

ADONITOL	-	MOBILIDADE	+
ARABINOSE	+	ONPG	+
ARGININA	-	ORNITINA	+
CITRATO	-	OXIDASE	-
GLICOSE	+	RAFINOSE	+
H ₂ S	-	RAMNOSE	+
HIDRÓLISE DA ESCULINA	-	REDUÇÃO DE NITRATO	+
INDOL	+	SACAROSE	+
INOSITOL	-	SORBITOL	+
LACTOSE	+	TRIPTOFANO DESAMINASE	-
LISINA	+	URÉIA	-
MALONATO	-	VP	-
MELOBIOSE	+		

PROVAS BIOQUÍMICAS CONFIRMADAS NO MICROSCAN (DADE) E MEIOS DE CULTURA PREPARADOS NO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE – PNCQ.

CORDIALMENTE,

DR. ESTEVÃO JOSÉ COLNAGO
ASSESSOR RESPONSÁVEL - MICROBIOLOGIA