

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA
LINHA DE PESQUISA: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS
DOS MATERIAIS**

FABIANE SCHREINER

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO ENDODÔNTICA DO GEL PRODUZIDO À BASE DO
EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. (ROMÃ)
CONTRA *Enterococcus faecalis*: EFEITO ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE**

**PONTA GROSSA
2016**

FABIANE SCHREINER

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO ENDODÔNTICA DO GEL PRODUZIDO À BASE DO
EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. (ROMÃ)
CONTRA *Enterococcus faecalis*: EFEITO ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE**

Tese apresentada para obtenção do título de doutor na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de
Doutorado em Odontologia – Área de concentração
em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nara Hellen Campanha
Bombarda.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizabete Brasil dos
Santos.

**PONTA GROSSA
2016**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S378 Schreiner, Fabiane
Análise da utilização endodôntica do gel produzido à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L. (Romã) contra *Enterococcus faecalis*: efeito antimicrobiano e toxicidade/ Fabiane Schreiner. Ponta Grossa, 2016.
109f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nara Hellen Campanha Bombarda.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Elizabete Brasil dos Santos.

1. *Punica granatum*. 2. Romã.
3. Anti-infecciosos. 4. Endodontia.
I. Bombarda, Nara Hellen Campanha. II. Santos, Elizabete Brasil dos. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

FABIANE SCHREINER

ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO ENDODÔNTICA DO GEL PRODUZIDO À BASE DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) CONTRA *Enterococcus faecalis*: EFEITO ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE

Tese apresentada para obtenção do título de doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 12 de agosto de 2016.



Prof.^a. Dr.^a. Nara Hellen Campanha Bombarda - Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG



Prof.^a. Dr.^a. Denise Madalena Palomari Spolidorio
Universidade Estadual Paulista – UNESP (Membro 1)



Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho
Universidade Federal do Paraná – UFPR (Membro 2)



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG (Membro 3)



Prof.^a. Dr.^a. Márcia Thaís Pochapski
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG (Membro 4)

DADOS CURRICULARES

2004 – 2008	Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).
2008 – 2008	Habilitação em Laserterapia pela Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa (ABO-PG).
2008 – 2008	Aperfeiçoamento em Marketing e Planejamento Fiscal em Odontologia pela Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa (ABO-PG).
2008 – 2009	Aperfeiçoamento em Endodontia em Molares pela Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa (ABO-PG).
2008 – 2009	Aperfeiçoamento em Implantodontia pela Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa (ABO-PG).
2009 – 2009	Aperfeiçoamento em Implantodontia Educação Continuada pela Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa (ABO-PG).
2009 – 2011	Especialização em Endodontia pela Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa (ABO-PG).
2010 – 2012	Mestrado em Odontologia - Área de Clínica Integrada - pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Dedico a meus pais **Mauro** e **Alaides Schreiner**, por terem me passado os valores do trabalho, da responsabilidade e da firmeza de caráter, por meio dos quais me senti segura para trilhar meus caminhos.

Dedico a minhas irmãs **Rejane** e **Evelise Schreiner**, que me ensinam a cada dia a força inerente à palavra família. Carinho e admiração por estas mulheres maravilhosas e grandes profissionais.

Dedico também a **Lucas Zaleski**, pelo apoio e carinho que contribuíram para a defesa e finalização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida e por todas as possibilidades que nela existem.

À **Prof.^a Dr.^a Nara Hellen Campanha Bombarda**, por orientar este trabalho com maestria, pela confiança ao longo da Graduação, do Mestrado e do Doutorado, por abraçar a ideia deste trabalho e por dividir comigo sua formação docente de forma tão brilhante e competente. Por todas as vezes em que sentei a seu lado, por todas as vezes que observei seu trabalho, por todas as vezes em que pegou em minha mão, muito obrigada!

À **Prof.^a Dr.^a Elizabete Brasil**, pela co-orientação na concretização deste estudo, pela exímia capacidade de adequar seu nível tão alto de preparo a uma estudante de Graduação, para estimulá-la a fazer uma iniciação científica, acolhê-la novamente no curso de Mestrado e orientá-la mais uma vez no curso de Doutorado. Por ser pedra fundamental em minha carreira.

Ào **Prof. Dr. Paulo Vitor Farago**, pela orientação sempre atenciosa e disponível, por ter construído uma carreira que serve como exemplo das potencialidades de um docente e por ser um modelo de profissional a se seguir.

Ao **Prof. Dr. Alfonso Sánchez-Ayala**, pelo auxílio imprescindível, que proporcionou a continuidade deste trabalho.

Aos professores **Ms. Wolnei Luiz Amado Centenaro** e **Ms. Valdomiro Simoneti** pelo exemplo, pelos ensinamentos, pelo auxílio e apoio na execução deste trabalho. É um privilégio iniciar minha carreira docente ao lado de profissionais brilhantes como os senhores.

À **Prof.^a Dr.^a Osnara Mongruel Gomes** e ao **Prof. Dr. João Carlos Gomes**, pela competência, brilhantismo e versatilidade profissional.

Aos **professores integrantes do corpo docente da Pós-graduação em Odontologia - Stricto Sensu da Universidade Estadual de Ponta Grossa**, pela rica contribuição em minha formação.

Às alunas de iniciação científica **Ataiane Ceron Bacchi, Ana Lúcia Spegiorin, Franciele Nilson, Kadija Ferla, Maria Nadir Colet, Renata Marsaroto, Suelen Arsego, Suelen Zanotelli, Tânia Paula Maciag** e, em especial, **Ticiane Wilhelm** e **Ana Paula Trentin**.

Aos **colegas de doutorado**, em especial à **Ana Cristina Kovalik Gonçalves** e **Elize Bonafé** pela amizade e parceria profissional, que atravessa tempo e distância.

Aos **funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa** e da **Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões** pela forma atenciosa com que sempre nos auxiliaram.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a
eletricidade e a energia atômica: a vontade.

(Albert Einstein)

Schreiner, F. Análise da utilização endodôntica do gel produzido a base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L. (romã) contra *Enterococcus faecalis*: efeito antimicrobiano e toxicidade. Tese – Doutorado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

RESUMO

Devido ao insucesso do tratamento endodôntico, da virulência e do aumento dos microorganismos resistentes a antibióticos houve uma maior incidência de infecções bacterianas. Os extratos de plantas são recursos promissores no controle de biofilmes, podendo ser considerados uma nova forma de prevenir e/ou tratar infecções. Dentre esses produtos de origem natural, destaca-se a *Punica granatum* L. (romã), que apresenta compostos fitoativos como os flavonóides e os fenóis. **Objetivo:** Analisar, *in vitro* e *ex vivo*, a ação antibacteriana de substância auxiliar e medicação intracanal à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L. (romã) veiculado em gel, contra *Enterococcus faecalis*. **Método:** Após desenvolvido o extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum*, foram realizados testes de difusão em ágar, determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) e análise da toxicidade (letalidade em microcrustáceo - *Artemia salina*). Com estes dados foi desenvolvido gel com extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* (0,5 g/mL), que foi testado por difusão em ágar e como substância auxiliar da instrumentação endodôntica e medicação intracanal, para a verificação da ação antimicrobiana em dentina infectada com *E. faecalis*, pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/mL) em três tempos experimentais. **Resultados:** A CIM foi de 0,5 g/mL e o gel de *P. granatum* nesta concentração apresentou halos de inibição de 8 mm, sobre *E. faecalis*. O gel de *P. granatum* reduziu em 96% a contagem de ufc/mL após instrumentação ($p=0,005$), com início de efetividade para uso como medicação intracanal ($p=0,047$), reduzindo a contaminação em 65%. A taxa de mortalidade em microcrustáceos foi de 42%, com LC₅₀ de 62,7 mg/mL, sendo o extrato levemente tóxico. **Conclusão:** O gel de *P. granatum* a 0,5 g/mL foi efetivo sobre *E. faecalis*, representando proposta promissora em Endodontia.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Romã. Anti-Infeciosos. Endodontia.

Schreiner, F. Analysis of endodontic use of the gel based on hydroglycolic pericarp extract of *Punica granatum* L. (pomegranate) against *Enterococcus faecalis*: antimicrobial effect and toxicity. Tese – Doutorado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

ABSTRACT

Due to endodontic treatment failure, virulence and increase of antibiotic resistant microorganisms bacterial infections had a greater incidence. Plant extracts are promising resources in the control of biofilms and can be considered a new way to prevent and / or treat infections. Among these natural products, there is the *Punica granatum* L. (pomegranate), which features bioactive compounds such as flavonoids and phenols. **Objective:** To analyze, *in vitro* and *ex vivo*, the antibacterial effect of auxiliary substances based on *Punica granatum* L. (pomegranate) against *Enterococcus faecalis*. **Method:** After developed the hydroglycolic peel extract of *Punica granatum* L. , agar diffusion tests, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) and analysis of toxicity (lethality in microcrustacean - *Artemia salina* were performed. With this data gel with hydroglycolic extract of *P. granatum* pericarp (0.5 g/mL) were developed and tested in agar diffusion, as auxiliary substance of endodontic instrumentation and as intracanal medication in infected dentin with *E. faecalis* by counting colony forming units per milliliter (cfu/mL) in three experimental times. **Results:** The MIC was 0.5 g/ml and *P. granatum* gel at this concentration showed 8 mm inhibition zones against *E. faecalis*. The *P. granatum* gel reduced 96% in cfu/mL after instrumentation ($p = 0.005$), with evidence of effectiveness for use as an intracanal medication ($p = 0.047$), reducing contamination by 65%. The brine shrimp mortality rate was 42%, with an LC_{50} of 62.7 mg/ml, being a slightly toxic extract. **Conclusion:** The pomegranate gel 0.5 g/ml was effective against *E. faecalis* and represents promising proposal in Endodontics.

Keywords: *Punica granatum*. Pomegranate. Anti-Infective Agents. Endodontics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore de <i>P. granatum</i> L.....	19
Figura 2	Fruto de <i>P. granatum</i> L.....	19
Figura 3	Embalagem original fechada.....	26
Figura 4	Pericarpo seco e padronizado.....	26
Figura 5	Moinho.....	27
Figura 6	Tamis II.....	27
Figura 7	Pericarpo cominuído e tamisado.....	27
Figura 8	Droga umedecida.....	28
Figura 9	Droga tamisada, inserida no percolador.....	28
Figura 10	Percolação.....	28
Figura 11	Banho-maria.....	28
Figura 12	Extrato em consistência xaroposa.....	28
Figura 13	Extrato hidroglicólico.....	28
Figura 14	Escala de McFarland.....	29
Figura 15	Suspensões dos microorganismos.....	29
Figura 16	Discos de feltro.....	30
Figura 17	Diluições de 1 a 0,6 g/mL.....	30
Figura 18	Paquímetro digital.....	30
Figura 19	Placa 96 poços com fundo em U.....	31
Figura 20	Transferência das alíquotas dos poços para placas de ágar BHI.....	32
Figura 21	Gel de romã e gel de carbopol.....	33
Figura 22	Cilindros metálicos para confecção de poços.....	33
Figura 23	Remoção da <i>smear layer</i>	34
Figura 24	Limpeza em cuba ultra-sônica.....	34
Figura 25	Tubos de ensaio com raízes em soro fisiológico.....	35
Figura 26	Comprovação da esterilidade.....	35
Figura 27	Espécimes em suspensão.....	36
Figura 28	Contaminação após 7 dias.....	36
Figura 29	Substituição de caldo BHI a cada 2 dias em câmara de fluxo laminar.....	36
Figura 30	Espécimes na plataforma de aço.....	37
Figura 31	Secagem com cone de papel.....	37
Figura 32	Transferência dos cones de papel para tubos tipo endorf.....	38
Figura 33	Secadura das suspensões em ágar BHI.....	38
Figura 34	Contagem de ufc/mL.....	38
Figura 35	Instrumentação com sistema rotatório.....	39
Figura 36	Fixação dos espécimes em placas de 24 poços com fundo plano.....	41
Figura 37	Placas vedadas para incubação.....	41
Figura 38	Ovos de <i>A. salina</i>	42
Figura 39	Eclosão dos ovos.....	42
Figura 40	Diluições seriadas das substâncias testadas quanto a letalidade em microcrustáceo.....	43
Figura 41	Náuplios fototrópicos, vistos em aparelho contador de colônias.....	43

Figura 42	Iluminação por 24 h.....	44
Figura 43	Contagem de náuplios mortos.....	44
Figura 44	Halos de inibição do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i>	49
Figura 45	Placa de 96 poços com fundo em U após incubação.....	50
Figura 46	Plaqueamento das alíquotas correspondentes os poços A1, A2, A3, B1, C3, D1, D2 e D3.....	51
Figura 47	Halos de inibição do teste de difusão em ágar utilizando-se os géis.....	52
Figura 48	Exemplo de contagem de ufc/mL inicial, após instrumentação e após medicação intracanal.....	53
Figura 49	Número de náuplios vivos de <i>Artemia salina</i> em diferentes concentrações das substâncias testadas após 24 h.....	54
Figura 50	Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de glicerina (mg/mL) da solução de álcool com glicerina.....	55
Figura 51	Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de álcool (mg/mL) da solução de álcool com glicerina.....	55
Figura 52	Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de álcool (mg/mL) da solução alcoólica.....	56
Figura 53	Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i> (mg/mL).....	56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação de Pesticidas recomendada pela OMS, 2004.....	46
Tabela 1	Concentração em mg/mL das substâncias testadas de acordo com a concentração em porcentagem utilizada para o teste de toxicidade.....	43
Tabela 2	Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i> sobre as bactérias testadas.....	47
Tabela 3	Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i> que tiveram ação estatisticamente semelhante à ação do digluconato de clorexidina 0,12% sobre as bactérias testadas.....	47
Tabela 4	Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i> que tiveram ação estatisticamente diferente à ação do digluconato de clorexidina 0,12% sobre as bactérias testadas.....	48
Tabela 5	Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i> que tiveram ação estatisticamente semelhante à ação do digluconato de clorexidina 2% sobre as bactérias testadas.....	48
Tabela 6	Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>P. granatum</i> que tiveram ação estatisticamente diferente à ação do digluconato de clorexidina 2% sobre as bactérias testadas.....	48
Tabela 7	Inibição do crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> em diferentes concentrações das substâncias testadas.....	50
Tabela 8	Inibição do crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> em diferentes concentrações das substâncias testadas, após confirmação da ausência de crescimento por plaqueamento em ágar.....	51
Tabela 9	Média dos halos de inibição (mm) dos géis testados sobre <i>Enterococcus faecalis</i>	52
Tabela 10	Média das unidades formadoras de colônia de <i>Enterococcus faecalis</i> antes da instrumentação (coleta 1), após instrumentação endodôntica (coleta 2) e após medicação intracanal (coleta 3) obtidas com a utilização dos géis.....	53
Tabela 11	Taxa de mortalidade da <i>Artemia salina</i> em diferentes concentrações das substâncias testadas (correção pela Fórmula de Abbot).....	54
Tabela 12	Concentração letal média (LC ₅₀) das substâncias testadas, obtida por meio de da equação de reta da regressão linear considerando o gráfico taxa de mortalidade corrigida pela fórmula de Abbot x concentrações testadas e comparação com a classificação com base nos valores de referência da OMS, 2004 (LT - Levemente tóxico).....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	<i>Punica granatum</i> L.....	19
3.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS DE <i>Punica granatum</i> L.....	20
3.3	DIFUSÃO EM ÁGAR DOS EXTRATOS DE <i>Punica granatum</i> L.....	21
3.4	UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS EXTRATOS DE <i>Punica granatum</i> L. NA ODONTOLOGIA.....	22
3.5	TOXICIDADE DE <i>Punica granatum</i> L.....	23
4	METODOLOGIA	25
4.1	MICRO-ORGANISMO.....	25
4.2	DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO.....	25
4.3	PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS MICRO-ORGANISMOS PARA TESTES INICIAIS DE VERIFICAÇÃO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	29
4.4	DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE CULTURAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	29
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE <i>Enterococcus faecalis</i>	30
4.6	CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L.....	32
4.7	DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS.....	32
4.8	AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DA DIFUSÃO EM ÁGAR.....	33
4.9	AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	34
4.9.1	Obtenção, seleção e padronização dos espécimes.....	34
4.9.2	Esterilização dos espécimes.....	35
4.9.3	Contaminação dos espécimes.....	36
4.9.4	Coleta microbiológica inicial (coleta 1)	37
4.9.5	Preparo químico-mecânico (PQM) e irrigação.....	39
4.9.6	Coleta microbiológica após PQM (coleta 2)	40
4.9.7	Medicação intracanal (coleta 3)	40
4.10	ANÁLISE DE TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO (BRINE-SHRIMP, <i>Artemia salina</i>).....	41

4.10.1	Eclosão dos ovos.....	41
4.10.2	Determinação da letalidade.....	42
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.11.1	Ação antimicrobiana do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>Punica granatum</i> L.....	44
4.11.2	Concentração inibitória mínima do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>Punica granatum</i> L.....	45
4.11.3	Concentração bactericida mínima do extrato hidroglicólico do pericarpo de <i>Punica granatum</i> L.....	45
4.11.4	Ação antimicrobiana dos géis por meio de da difusão em ágar.....	45
4.11.5	Ação antimicrobiana dos géis em dentina infectada.....	45
4.11.6	Análise de toxicidade do extrato hidroglicólico de <i>Punica granatum</i> L. por meio de da determinação de letalidade em microcrustáceo (Brine-Shrimp, <i>Artemia salina</i>).....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE CULTURAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	47
5.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE <i>Enterococcus faecalis</i>	49
5.3	CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L.....	50
5.4	AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	51
5.5	AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	52
5.6	ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	53
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A - DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES HUMANOS DA UEPG	66
	ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA	67
	APÊNDICE A - DADOS PRIMÁRIOS EM MILÍMETROS DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE CULTURAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Klebsiella sp.</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR (MEDIÇÕES DE HALOS DE INIBIÇÃO)	69

APÊNDICE B - DADOS PRIMÁRIOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE <i>Enterococcus faecalis</i>	70
APÊNDICE C - DADOS PRIMÁRIOS EM mm DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR (MEDIÇÃO DOS HALOS DE INIBIÇÃO) E DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	71
APÊNDICE D - DADOS PRIMÁRIOS DA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	73
APÊNDICE E - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE CULTURAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	74
APÊNDICE F - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE <i>Enterococcus faecalis</i> POR ANÁLISE VISUAL DE CRESCIMENTO.....	77
APÊNDICE G - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO GEL COM EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>P. granatum</i> (0,5 g/mL), POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR SOBRE <i>E. faecalis</i>	78
APÊNDICE H - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA NOS TRÊS TEMPOS EXPERIMENTAIS (INICIAL, PÓS INSTRUMENTAÇÃO E APÓS USO COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL).....	79
APÊNDICE I - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	82
APÊNDICE J - ANOVA COM PÓS-TESTE SCHEFFÉ PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO E AS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE <i>Punica granatum</i> L. SOBRE CULTURAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	83
APÊNDICE K - ANOVA COM PÓS-TESTE SCHEFFÉ PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR....	92

APÊNDICE L - TESTE FRIEDMAN PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRÊS TEMPOS EXPERIMENTAIS, COM PAREAMENTO DE DENTES, PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	94
APÊNDICE M - TESTE KRUSKAL-WALLIS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS TRÊS SUBSTÂNCIAS PARA VERIFICAÇÃO AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	97
APÊNDICE N - TESTE WILCOXON PARA COMPARAÇÃO PAR-A-PAR ENTRE OS TEMPOS EXPERIMENTAIS, COM PAREAMENTO DE DENTES, PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	98
APÊNDICE O - TESTE MANN-WHITNEY PARA COMPARAÇÃO PAR-A-PAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA.....	99
APÊNDICE P - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM A GLICERINA PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	102
APÊNDICE Q - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM O ÁLCOOL COM GLICERINA PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	104
APÊNDICE R - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM A SOLUÇÃO ALCOÓLICA PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	106
APÊNDICE S - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM O EXTRATO PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO.....	108

1 INTRODUÇÃO

O foco do tratamento endodôntico é restabelecer a saúde e as funções dos dentes, por meio de limpeza, modelagem e desinfecção do sistema de canais radiculares por meio do preparo químico-mecânico, em casos de necropulpectomia, otimizando a redução microbiana e possibilitando maior acesso das substâncias à porção apical do canal radicular.¹ Diversos protocolos para o tratamento de canais radiculares foram propostos, suas etapas são igualmente importantes para o sucesso da terapia, observando-se cuidadosamente seus princípios para uma correta execução.²⁻⁷ A efetividade das limas endodônticas, manuais ou mecanizadas, das soluções irrigadoras e dos agentes quelantes em limpar, modelar e desinfetar canais radiculares sustenta o sucesso, a longevidade e a confiabilidade dos tratamentos.⁸ Deve-se também considerar a influência do tecido no qual a técnica é aplicada, a dentina radicular é formada por túbulos que se dispõem de forma desigual com relação ao terço observado, ao grupo dental, à idade do paciente e às agressões sofridas pelo dente.⁹ Esta estrutura pode atuar decisivamente na qualidade do tratamento, os túbulos dentinários compreendem a maior via de acesso para a difusão de substâncias e micro-organismos.¹⁰

A permeabilidade dentinária pode ser influenciada pelo diâmetro do canal radicular, pela integridade do dente, pela natureza das substâncias químicas utilizadas durante o tratamento, pela *smear layer* formada durante o preparo e pelo grau de obstrução dos túbulos (*smear plugs*), seja pelo impedimento da penetração de substâncias ou pela resistência a sua difusão.^{11, 12} Neste sentido, a instrumentação mecanizada com NiTi permite a ampliação adequada do diâmetro dos canais radiculares, em forma de funil, sem que instrumentação adicional seja necessária; assim, não há maior produção de *smear layer*, contribuindo para a redução da penetração da mesma no interior dos túbulos dentinários (*smear plugs*), ressaltando o conceito de limpeza e modelagem dos canais radiculares, no qual a limpeza é melhorada após a modelagem.¹³ A interferência da *smear layer* e da esclerose dentinária também parece ter papel fundamental na adesão de micro-organismos, a exemplo de *Prevotella nigrescens*, que apresentou consideravelmente menor aderência bacteriana quando o produto do preparo do canal foi removido, indicando que a não remoção ou sua maior produção aumentariam a chance de recontaminação do canal.¹⁴

A microbiota de canais radiculares com falha do tratamento endodôntico compreende um número limitado de espécies microbianas, predominantemente Gram-positivas, sendo o micro-organismo anaeróbio facultativo *Enterococcus faecalis* um dos mais

comumente isolados.¹⁵ Sua escolha para estudos se dá por estar presente em todas as fases de desenvolvimento de infecção nos canais radiculares, por colonizar rápida e eficientemente os túbulos em comparação com outras cepas e por ter a capacidade de penetração nos túbulos dentinários, com média de profundidade de 420 µm em dentes jovens e 360 µm em dentes senis.¹⁶ A habilidade natural dos enterococos para facilmente adquirir, acumular e compartilhar elementos extracromossomais, codificando traços de virulência ou genes de resistência a antibióticos, atribui-lhes vantagens para a sua sobrevivência sob estresses ambientais incomuns, podendo tornar inadequada a quimioterapia convencional para infecções graves provocadas por este micro-organismo.¹⁷ No que compete ao tratamento das infecções endodônticas, a falta de circulação em canais radiculares torna ineficiente o uso de antibióticos sistêmicos, então, a terapia antimicrobiana tópica e a instrumentação mecânica são necessárias.¹⁸ A remoção de *E. faecalis* parece ser similar quando as substâncias auxiliares hipoclorito de sódio 5,25%, solução de clorexidina 2% e gel de clorexidina 2% são comparadas, porém, este último promove a melhor limpeza das paredes do canal radicular, sendo superado neste quesito apenas pelo EDTA 17%.¹⁹

A utilização de extratos de plantas na terapia endodôntica tem sido investigada tanto em relação à habilidade de limpeza dos canais radiculares quanto ao seu efeito antimicrobiano.²⁰ Especificamente em relação à utilização de *Punica granatum* (*P. granatum*), extratos têm sido testados para o controle de patógenos orais, responsáveis por doenças como cárie, estomatite e doença periodontal.²¹ Seu efeito antimicrobiano tem se mostrado sobre bactérias como *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus*,²² e fungos como *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula rubra* e *Candida albicans*.²³ Os antimicrobianos proveniente de *P. granatum*, como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, localizam-se em grande concentração no pericarpo do fruto, que é um resíduo do consumo, e podem ser facilmente extraídos a um custo reduzido.²⁴

Mesmo com diversos protocolos bem estabelecidos, o insucesso do tratamento endodôntico ainda está associado à virulência e à resistência microbiana, havendo a necessidade de pesquisa de alternativas para o tratamento tópico destas infecções, sendo a fitoterapia um campo promissor para este fim. Formas farmacêuticas obtidas a partir de compostos naturais, como os extratos, têm ganhado atenção das comunidades científica e médica, das comissões de regulamentação e dos estabelecimentos comerciais, inclusive para a reprodução de cultivos com maiores quantidades de antioxidantes, flavonóides e outros compostos terapeuticamente ativos,²⁵ como os encontrados na *P. granatum*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, *in vitro* e *ex vivo*, o efeito antimicrobiano e a toxicidade do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L. (romã), com foco em sua utilização endodôntica na forma de gel contra *Enterococcus faecalis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L.
2. Avaliar a ação antimicrobiana do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* sobre *P. aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *E. coli*, *S. auerus* e *E. faecalis*.
3. Obter um gel à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* para ser utilizado como substância auxiliar da instrumentação endodôntica e medicação intracanal.
4. Verificar a ação antimicrobiana do gel à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* sobre *E. faecalis*.
5. Testar a ação antimicrobiana do gel à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* como auxiliar no preparo químico-mecânico de canais radiculares contaminados com *E. faecalis*, em pré-molares extraídos.
6. Investigar a ação antimicrobiana do gel à base do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* como medicação intracanal em canais radiculares contaminados com *E. faecalis*, em pré-molares extraídos.
7. Determinar a toxicidade do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* sobre *Artemia salina*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Punica granatum* L.

Punica granatum Linnaeus, conhecida popularmente como romã, é uma planta considerada como uma pequena árvore (Figura 1), podendo chegar a se transformar em um grande arbusto, da família *Lythraceae*, nativa de Afeganistão, Irã, China e Índia.^{26, 27} Seu fruto (Figura 2), consumido amplamente ao redor do mundo, é definido como uma maçã granular, delimitada lateralmente por uma casca, cujas sementes são envoltas por cápsulas gelatinosas translúcidas (arilos), com sabor levemente ácido.²⁷ Atualmente, é cultivada em áreas tropicais e subtropicais, adaptando-se a condições climáticas variadas, adquirindo assim ampla diversidade genética.²⁸ Fonte de diversos compostos químicos bioativos, o cultivo, as condições ambientais, o estágio de amadurecimento, a forma de armazenamento, o tratamento após a colheita e diversos outros fatores podem interferir na qualidade e na distribuição destes compostos.



Figura 1: Árvore de *P. granatum* L.



Figura 2: Fruto de *P. granatum* L.

3.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS DE *Punica granatum* L.

Al-Zoreky (2009)²⁹ definiu a concentração inibitória mínima do extrato metanólico da casca de *P. granatum* sobre as bactérias *Listeria monocytogenes* (0,5 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (2 mg/mL), *S. aureus* MRSA (2 mg/mL), *Bacillus subtilis* (0,5 mg/mL), *Escherichia coli* (1 mg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (2 mg/mL), *Yersinia enterocolitica* (0,25 mg/mL) e *Salmonella enteritidis* (4 mg/mL).

Aqil, Ahmad (2007)³⁰ analisaram a promissora atividade de amplo espectro de plantas tradicionais contra bactérias resistentes a múltiplas drogas e realizaram uma análise de fitocompostos (bioautografia TLC) para identificação de alcalóides, flavonoides, fenóis, taninos e saponinas. A concentração inibitória mínima do extrato etanólico da casca de *P. granatum* sobre diversas cepas de *S. aureus* MRSA (resistente à meticilina) foi de 1,8 mg/mL, sobre *S. aureus* MSSA (sensível à meticilina) foi de 1,8 mg/mL e sobre as bactérias Gram negativas produtoras de ESBL (beta-lactamase de espectro estendido) como *E. coli* foi de 3,6 mg/mL, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter* sp. e *Shigella sonnei* foi de 1,8 mg/mL. Os compostos fitoativos principais foram os flavonoides e os fenóis.

Duman et al. (2009)²³ investigaram a concentração inibitória mínima do extrato do fruto de seis variedades de *Punica granatum* e avaliaram sua correlação com as propriedades pomológicas (técnicas de cultivo e estudo fisiológico do fruto) e fitonutrientes (conteúdo fenólico e capacidade antioxidante total). Entre os micro-organismos testados, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* foram inibidos com concentrações de 40 a >90 µg/mL, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* com variação de 30 a >90 µg/mL. No geral, a extensão do efeito inibitório pôde ser atribuída ao conteúdo fenólico e de antocianinas.

Vahid Dastjerdi et al. (2014)³¹ analisaram o efeito do extrato aquoso da flor de *P. granatum* sobre cinco bactérias bucais comuns e sobre a formação de biofilme em fios ortodônticos. A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) foram idênticas para *Streptococcus mutans* (50 mg/mL), *Streptococcus sobrinus* (25 mg/mL) e *E. faecalis* (50 mg/mL) e variaram para *Streptococcus sanguinis* (MIC 6,25 e MBC 25 mg/mL) e *Streptococcus salivarius* (MIC 25 e MBC 100 mg/mL).

3.3 DIFUSÃO EM ÁGAR DOS EXTRATOS DE *Punica granatum* L.

Al-Zoreky (2009)²⁹ investigou um espectro antimicrobiano (*in vitro* e *in situ*) dos extratos aquoso, metanólico e etílico (éter dietílico) da casca de *P. granatum* e verificou a relação entre a inibição microbiana e o conteúdo fenólico total (equivalentes do ácido gálico) dos extratos. Identificou efetividade do extrato metanólico da casca de *P. granatum* sobre *L. monocytogenes* (20 mm), *S. aureus* (13 mm), *S. aureus* MRSA (16 mm), *B. subtilis* (17 mm), *E. coli* (16 mm), *P. aeruginosa* (18 mm), *K. pneumoniae* (16 mm), *Y. enterocolitica* (19 mm), *Candida utilis* (18 mm), *Saccharomyces cerevisiae* (14 mm) e *Aspergillus niger* (12 mm). Os extratos aquoso e etílico não apresentaram atividade.

Aqil, Ahmad (2007)³⁰ avaliaram a ação antimicrobiana isolada de plantas de uso tradicional e sua interação sinérgica com vários antibióticos sobre micro-organismos resistentes a múltiplas drogas. *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa* apresentaram halos de inibição entre 10-20 mm, *B. subtilis* e *Staphylococcus epidermidis* de 21-30 mm e *S. aureus*, *Salmonella paratyphi* e *S. disenteriae* de 31-40 mm. Sobre *S. aureus* MSSA o extrato de *P. granatum* apresentou um halo de inibição de 8 mm, a tetraciclina de 11 mm e o efeito sinérgico de 23 mm. Sobre *E. coli* o extrato apresentou 10 mm, a tetraciclina 12 mm, com efeito sinérgico de 26 mm; sem efeito sinérgico com a ciprofloxacina.

Dey et al. (2012)³² combinaram a ação do extrato metanólico da casca de *P. granatum* com a da ciprofloxacina contra *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (beta-lactamase de espectro estendido) e contra *P. aeruginosa* produtora de MBL (metalo- β -lactamase), além de outras bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os diâmetros das zonas de inibição obtidas para o extrato de *P. granatum* sobre *S. aureus* foi 18 mm, *Streptococcus pyogenes* 23 mm, *Escherichia coli* 15 mm, *K. pneumoniae* 18 mm, *Proteus vulgaris* 18 mm e *P. aeruginosa* 20 mm.

Duman et al. (2009)²³ investigaram a atividade antimicrobiana do extrato do fruto de seis variedades de *Punica granatum* sobre diversos micro-organismos. Entre diversos micro-organismos testados, os halos de inibição para *P. aeruginosa* variaram de 19,3 a 20,3 mm, para *S. aureus* de 12,7 a 20,3 mm, para *E. coli* de 21,3 a 26 mm, *E. faecalis* de 12,7 a 24 mm e para *C. albicans* de 20,7 a 23,7 mm. A bioatividade dos extratos foi atribuída ao alto conteúdo de flavonoides, compostos fenólicos, antocianinas e ácidos orgânicos. A cor vermelha mais intensa e a conseqüente maior quantidade de antocianinas têm correlação com o efeito inibitório. O teor de sólidos solúveis (Brix) e o pH parecem estar correlacionados com o efeito de inibição contra *E. faecalis*.

Duraipandiyan; Ayyanar; Ignacimuthu (2006)³³ avaliaram a bio-atividade de diversas plantas, incluindo o extrato de *P. granatum* obtido por percolação, e identificaram sua atividade antimicrobiana. O extrato metanólico de *P. granatum* na concentração de 1,5 mg formou halos de inibição de 11 mm para *B. subtilis*, 12 mm para *S. aureus*, 10 mm para *S. epidermidis* e 9 mm para *C. albicans*. Na concentração de 2,5 mg, 14 mm para *B. subtilis*, 15 mm para *S. aureus*, 12 mm para *S. epidermidis*, 8 mm para *E. faecalis*, 8 mm para *Escherichia coli* e 12 mm para *C. albicans*. A 5 mg os halos foram de 18 mm para *B. subtilis*, 19 mm para *S. aureus*, 14 mm para *S. epidermidis*, 9 mm para *E. faecalis*, 9 mm para *E. coli* e 15 mm para *C. albicans*. O extrato de *P. granatum* à base de hexano não apresentou atividade. Entre as plantas testadas, a *P. granatum* foi uma das que mostraram as propriedades antimicrobianas mais promissoras, indicando potencial para descoberta de princípios antibacterianos.

Sharma et al. (2009)³⁴ avaliaram extratos de dezessete plantas, incluindo a *P. granatum*, contra patógenos do trato urinário. Os extratos de *P. granatum* à base de etanol e acetona foram efetivos sobre *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Sobre *E. faecalis* o extrato etanólico apresentou halo de 9 mm e o extrato acetônico 11 mm. Sobre *E. coli* o extrato etanólico apresentou 14 mm e o extrato acetônico 12 mm. Sobre *K. pneumoniae* ambos apresentaram 13 mm. E sobre *P. aeruginosa* apresentaram 13 e 12 mm, respectivamente. As plantas estudadas demonstraram ser ricas em compostos antimicrobiano.

Vahid Dastjerdi et al. (2014)³¹ analisaram o efeito antimicrobiano do extrato aquoso da flor de *P. granatum*, em diversas concentrações, sobre cinco bactérias bucais comuns, quatro espécies de estreptococos e *E. faecalis*. Obtiveram halos microbianos de 14 a 18 mm os estreptococos e de 10,5 mm para *E. faecalis* na concentração de 100 mg/mL de extrato. Para o *E. faecalis*, halos de 9,5 mm foram observados na concentração de 50 mg/mL e não houve inibição nas concentrações de 25 a 3,12 mg/mL.

3.4 UTILIZAÇÃO CLÍNICA DOS EXTRATOS DE *Punica granatum* L. NA ODONTOLOGIA

Batista et al. (2014)³⁵ avaliaram clinicamente por meio de um estudo randomizado, controlado pelo uso de solução de clorexidina a 0,12% e duplo cego o efeito de enxaguatórios herbais com extratos etanólicos dos espécimes secos de *Matricaria recutita* L. (camomila) e de *P. granatum*, separadamente, obtidos pelo método da turbólise, sobre a redução do sangramento gengival, comparando-os com a solução de clorexidina a 0,12%.

Tanto a camomila quanto a *P. granatum* foram efetivas na redução do sangramento gengival na doença periodontal.

Ghalayani et al. (2013)³⁶ investigaram por meio de um estudo clínico randomizado, controlado por placebo e duplo cego a eficácia do gel oral à base do extrato etanólico das flores de *P. granatum* a 10%, obtido por meio de percolação, veiculado em metil celulose, no manejo clínico da estomatite aftosa recorrente. A aplicação tópica do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* pode se apresentar como um tratamento efetivo contra a úlcera aftosa menor.

Vasconcelos et al. (2003)³⁷ avaliaram um gel, veiculado por meio de carbopol, com extrato fluido dos frutos frescos de *P. granatum*, obtido por meio de percolação, para o tratamento da candidose associada à estomatite protética por meio de um estudo clínico randomizado, controlado com miconazol e duplo cego. Os achados clínicos e laboratoriais foram promissores, sem reclamações ou efeitos colaterais relatados pelos pacientes.

3.5 TOXICIDADE DE *Punica granatum* L.

Aqil, Ahmad (2007)³⁰ pesquisaram a toxicidade de plantas com efeito antimicrobiano sobre bactérias resistentes a múltiplas drogas por meio de testes de hemólise (ensaio de toxicidade com eritrócitos de ovelha). O extrato etanólico da casca de *P. granatum* na concentração de 100 mg/mL não apresentou ação hemolítica, tanto na diluição de 1:1000 quanto de 1:1.

Al-Shafi (2002)³⁸ identificaram e separaram proteínas plasmáticas tratadas com compostos fenólicos de plantas nativas do Iraque que os contêm em grande quantidade, como o pericarpo de *Lythraceae*, família de *P. granatum*. Em relação à *P. granatum*, frações de albumina e globulinas sofrem alteração gradual dependendo do tipo e da concentração do composto fenólico. Assim como estes compostos podem ser convertidos em metabólitos solúveis em água sendo facilmente excretados com potencial mínimo de toxicidade, também pode ocorrer o inverso, ou seja, a produção de um efeito tóxico.

Altunkaia et al. (2013)³⁹ pesquisaram a qualidade e a segurança da adição do extrato etanólico da casca de *P. granatum* ao suco de romã, investigando o efeito na cor, a acidez total, o conteúdo fenólico e de açúcar e a toxicidade estimada pelo teste sobre *Artemia salina*. A taxa de letalidade sem adição de extrato foi de 25%. Com a adição de 0,05 a 5

mg/mL de extrato, a taxa variou de forma crescente de 27 a 82%. Foi identificado um claro aumento dose-dependente na letalidade, sendo que o aumento do número de náuplios mortos a partir do acréscimo de extrato de *P. granatum* a 0,5 mg/mL foi menos significativo, sugerindo ser este um limite seguro para uso do extrato.

Cerda et al. (2003)⁴⁰ avaliaram o efeito da administração oral de altas doses diárias de extrato aquoso de *P. granatum* contendo punicalgina no crescimento, nas enzimas antioxidantes, nos parâmetros químicos clínicos e hematológicos e nos possíveis órgãos-alvo de ratos. Uma concentração constante de punicalgina foi identificada no plasma após 7 dias, não sofrendo aumento após este período. O consumo de ração foi mais baixo para ratos tratados com punicalgina nos primeiros 15 dias, sendo o consumo maior do que o de ratos não tratados após 21 dias. Os parâmetros bioquímicos para avaliação da integridade dos hepatócitos, alterações do ducto biliar e função hepática foram normais. Não foram identificadas alterações nos órgãos-alvo, fígado (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e bilirrubina) e rim (uréia e creatinina). As enzimas antioxidantes glutathione transferase e superóxido dismutase também não sofreram alteração.

Les et al. (2015)⁴¹ testaram as propriedades biológicas do suco de *P. granatum* e sua ação sobre *Artemia salina* nas concentrações de 1 a 1000 ug/mL. A viabilidade nos náuplios não sofreu alteração. Ainda, o suco de *P. granatum* diminuiu o efeito da toxicidade do peróxido de hidrogênio, sendo que o tratamento associado com doses de 1 a 0,25 mg/mL aumentou a taxa de sobrevivência a um nível de 80 - 100%. Na faixa de 0,001 a 1 mg/mL o suco de *P. granatum* não foi considerado tóxico.

4 METODOLOGIA

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados neste estudo pertencem às cepas da American Type Culture Collection (ATCC), sendo:

-*Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 27853.

-*Klebsiella sp*: ATCC 10031.

-*Escherichia coli*: ATCC 25922.

-*Staphylococcus aureus*: ATCC 25923.

- *Enterococcus faecalis*: ATCC 29212.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO

Foi adquirido o pericarpo seco e padronizado de *Punica granatum* L. (Chamel, Campo Largo, PR-Brasil) - Figuras 3 e 4. O produto foi mantido em embalagem original, fechada, ao abrigo do calor e da umidade, em local seco e arejado, a fim de preservar suas características. O extrato hidroglicólico (1g/mL) foi desenvolvido segundo monografia do extrato fluido de *Krameria argentea* Martius (ratânia) da Farmacopéia Brasileira (1959)⁴², método consagrado pelo uso, com adequações mencionadas no Formulário de Fitoterápicos - Farmacopéia Brasileira (2011)⁴³. A *K. argentea* foi utilizada como monografia de referência por, assim como a *P. granatum*, possuir grande quantidade de taninos.^{44, 45} Os líquidos extratores utilizados foram os descritos para o processo B do método de Extração de Fluidos da Farmacopéia (1959)⁴², sendo: 200 mL de solução de glicerina e álcool (10% de glicerina, 50% de álcool absoluto/etanol e 40% de água purificada) e 1 L de solução alcoólica (etanol 50% v/v), uma vez que a glicerina facilita a dissolução de taninos.



Figura 3: Embalagem original fechada.



Figura 4: Pericarpo seco e padronizado.

O pericarpo foi cominuído em moinho com peneira embutida (Marconi, Piracicaba, Brasil, Figura 5) e tamisado em Tamis II (Figura 6) até se obter 40 g de um pó fino (60 mesh - 250 μm - Figura 7).²⁶ A droga foi umedecida com quantidade suficiente (q.s.) da solução de glicerina e álcool até iniciar a precipitação do líquido (Figura 8), sendo utilizados cerca de 150 mL, e deixada em repouso por 2 horas em recipiente fechado. Após, a droga umedecida foi tamisada em Tamis II, inserida no percolador (Figura 9) juntamente com o restante da solução de glicerina e álcool, que formou uma camada sobre a superfície da droga. Quando o extrato começou a gotejar, a droga foi macerada em percolador tampado, ao abrigo da luz, por 24 horas (Figura 10). Após maceração, foi iniciada a percolação à velocidade moderada (1 a 3 mL/min - 1 gota/segundo), sendo reservados os primeiros 34 mL. Solução alcoólica foi adicionada constantemente, tomando-se o cuidado de não deixar o líquido desaparecer da superfície antes de nova adição, até esgotamento da droga (recuperação apenas de álcool 50%). O volume percolado foi concentrado em banho-maria (Figura 11 - máximo de 60°C) até apresentar consistência xaroposa, formando cerca de 6 mL (Figura 12). O xarope foi dissolvido na porção de extrato reservada previamente e q.s. de solução alcoólica foi adicionada para 40 mL de solução, no caso de não completar o volume. O extrato foi acondicionado em frasco de vidro âmbar bem fechado com batoque, em local fresco, seco e ao abrigo da luz (Figura 13).



Figura 5: Moinho.



Figura 6: Tamis II.



Figura 7: Pericarpo cominuído e tamisado.



Figura 8: Droga umedecida.



Figura 9: Droga tamisada, inserida no percolador.



Figura 10: Percolação.



Figura 11: Banho-maria.

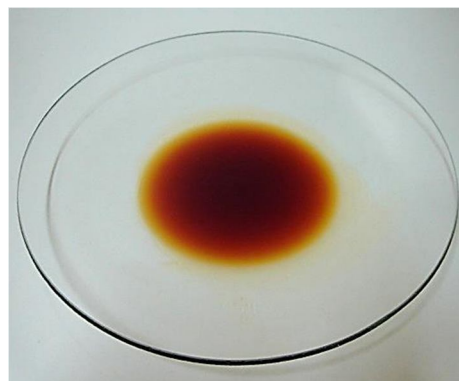


Figura 12: Extrato em consistência xaroposa.



Figura 13: Extrato hidroglicólico.

4.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS MICRO-ORGANISMOS PARA TESTES INICIAIS DE VERIFICAÇÃO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA

A partir de culturas de 24 h do micro-organismo *Enterococcus faecalis*, foram preparadas suspensões com 10^8 células/mL em solução fisiológica estéril, padronizadas em espectrofotômetro comparando a turbidez com o padrão 0,5 da Escala de McFarland (Figura 14), com comprimento de onda de 580 nm e absorvância entre 0,08 e 0,10 (Micronal B220, Santo Amaro, SP-Brasil). Da mesma forma foram realizadas suspensões de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, para verificação da amplitude da atividade do extrato (Figura 15).



Figura 14: Escala de McFarland.

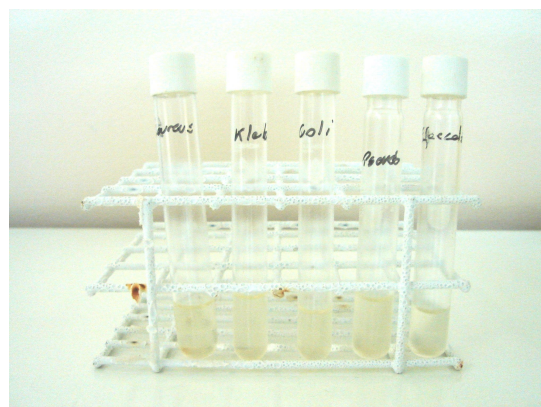


Figura 15: Suspensões dos micro-organismos.

4.4 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Para um levantamento da atividade inicial do extrato, 50 μ L das suspensões previamente padronizadas foram semeados em triplicata, com auxílio de swab, em placas contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), sendo incubadas a 37°C/10 min para secagem. A seguir, foram inseridos discos (Figura 16) embebidos com aproximadamente 10 μ L das diluições do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* de 1 a 0,06 g/mL (Figura 17). O controle positivo foi realizado com digluconato de clorexidina a 0,12% e 2% e o negativo com soro fisiológico. Após incubação em estufa bacteriológica por 24 h a 37°C, foram

medidos os diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, com paquímetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil). As mensurações foram feitas colocando-se o instrumento (Figura 18) em três posições diferentes, obtendo assim uma média para cada halo de inibição, de cada substância e em cada uma das placas.⁴⁶



Figura 16: Discos de filtro.

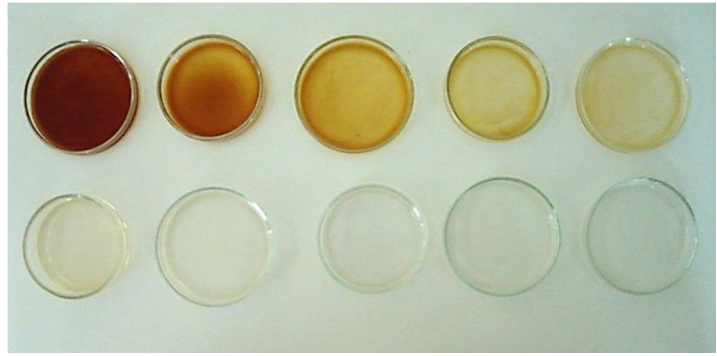


Figura 17: Diluições de 1 a 0,6 g/mL.



Figura 18: Paquímetro digital.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE *Enterococcus faecalis*

Foi utilizado o teste de microdiluição, seguindo os Padrões Laboratoriais Clínicos do Comitê Nacional (NCCLS)⁴⁷, para determinação da concentração inibitória mínima em placas de 96 poços com fundo em U (Figura 19). Foi testada a diluição seriada do extrato de *P. granatum* nas colunas 1, 2 e 3, a diluição seriada da solução de glicerina e álcool nas colunas 4, 5 e 6 e a diluição seriada da solução alcoólica nas colunas 7, 8 e 9⁴⁸, exceto na linha H, para verificação do comportamento inibitório dos líquidos extratores utilizados para

obtenção do extrato. O controle positivo com digluconato de clorexidina 0,12% (linhas A e B, colunas 10, 11 e 12) foi utilizado por se tratar de um produto de ação tópica em mucosa e com digluconato de clorexidina 2% (linhas D e E, colunas 10, 11 e 12) por se tratar de um produto de utilização intracanal. Para o controle negativo foi utilizado caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com inóculo (linha G e H, colunas 10, 11 e 12) e poços padrão apenas com caldo BHI (linha H, colunas 1 a 9). Foram inseridos 100 μ L de caldo BHI e dispensados 100 μ L das substâncias nos primeiros poços, seguindo a sequência anteriormente mencionada. O mesmo foi feito para as soluções de clorexidina nas diferentes concentrações. Diluições seriadas foram realizadas da linha A até a linha G, removendo-se 100 μ L do primeiro poço e os acrescentando ao segundo e assim sucessivamente, sendo os últimos 100 μ L descartados. A seguir, uma quantidade de 100 μ L da suspensão de *E. faecalis* previamente padronizada foi adicionada, exceto para os poços padrão que não receberam o inóculo. As placas foram tampadas, protegidas com papel filme e incubadas a 37°C por 24 horas. A análise do crescimento microbiano foi visual.

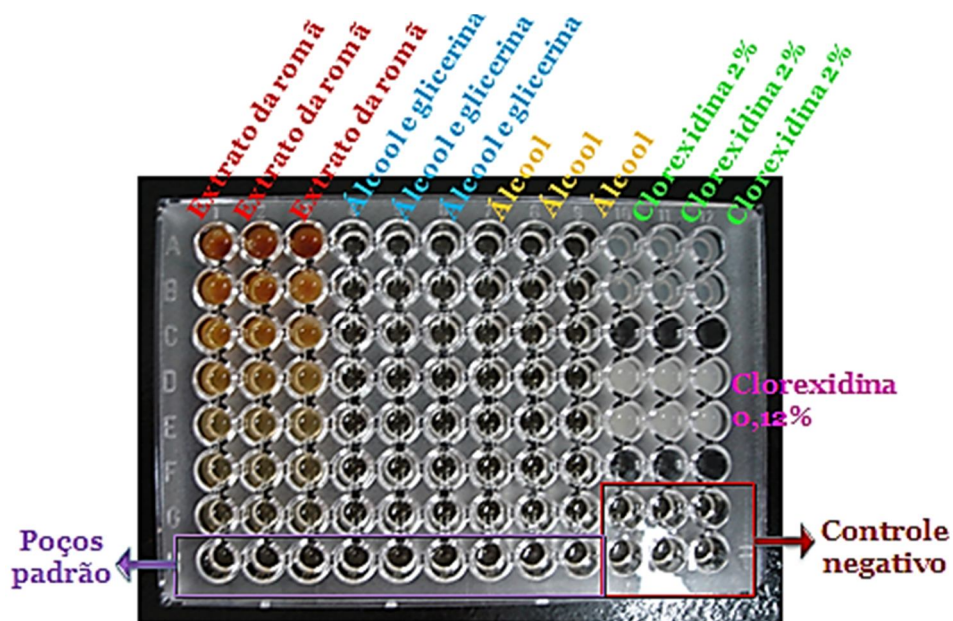


Figura 19: Placa 96 poços com fundo em U.

4.6 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L.

Após leitura visual do teste de concentração inibitória mínima, alíquotas de 50 μL de cada poço foram transferidas para placas contendo ágar BHI (Figura 20), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a ausência de crescimento foi verificada, classificando a concentração como bactericida. Concentrações que não apresentaram crescimento visual ao se analisar os poços mas que apresentaram crescimento de colônias ao plaqueamento foram consideradas bacteriostáticas.³¹



Figura 20: Transferência das alíquotas dos poços para placas de ágar BHI.

4.7 DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS

Após definição da concentração inibitória (bactericida), foi solicitada à Farmácia de Manipulação Artesani (Erechim, Brasil) a manipulação do gel de *P. granatum* na concentração desejada incorporado em carbopol (Figura 21). Também foi solicitada a manipulação de gel de digluconato de clorexidina a 2% incorporado em hidroxietilcelulose para realização do controle positivo e dos géis de carbopol e de hidroxietilcelulose para os controles negativos.



Figura 21: Gel de romã e gel de carbopol.

4.8 AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DA DIFUSÃO EM ÁGAR

Uma quantidade de 50 μL da suspensão de *E. faecalis* previamente padronizada foi semeada em triplicata com auxílio de swab, em placas contendo ágar BHI, sendo incubadas a 37°C/10 min para secagem. A seguir, foram confeccionados poços de 4 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade com cilindros metálicos (Figura 22). Os poços foram preenchidos com gel de *P. granatum* em carbopol, gel de digluconato de clorexidina a 2% em hidroxietilcelulose (controle positivo), gel de carbopol (controle negativo - veículo de *P. granatum*) e gel de hidroxietilcelulose (controle negativo - veículo da clorexidina). Após incubação em estufa bacteriológica por 24h a 37°C, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, com paquímetro digital (Digimes, São Paulo, Brasil). As mensurações foram feitas colocando-se o paquímetro digital em três posições diferentes, obtendo assim uma média para cada halo de inibição, de cada substância auxiliar e em cada uma das placas, da mesma forma que a leitura realizada para o teste de ação antimicrobiana do extrato.⁴⁶



Figura 22: Cilindros metálicos para confecção de poços.

4.9 AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

4.9.1 Obtenção, seleção e padronização dos espécimes

Foi utilizado um total de 30 pré-molares inferiores com ápices completos e canal radicular único, conferido radiograficamente. Os dentes foram obtidos do Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (BDH-UEPG), sob aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP Parecer número 1.071.337). Com a utilização de curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, IL-EUA) as superfícies externas das raízes foram limpas de possíveis restos de tecido periodontal ou ósseo que estivessem aderidos. Utilizando uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, IL, EUA) e um disco de diamante (Diamond Wafering Blade, Series 15LC, Buehler, EUA) a 350 rpm sob irrigação constante, as coroas foram removidas e o comprimento das raízes padronizado em 16 mm. Os canais radiculares e o forame apical foram alargados com a utilização de limas tipo K (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça) até o calibre 25 sob irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5%. A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante toda a instrumentação. A remoção da *smear layer* formada pela instrumentação nas paredes do canal durante a padronização dos espécimes foi realizada em cuba ultra-sônica (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP-Brasil) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% por 4 min (Figura 23), seguido de hipoclorito de sódio a 5.25% por 4 min e, finalmente, em soro fisiológico pelo mesmo tempo (Figura 24).⁴⁹



Figura 23: Remoção da *smear layer*.



Figura 24: Limpeza em cuba ultra-sônica.

4.9.2 Esterilização dos espécimes

A esterilização dos espécimes foi feita de acordo com o descrito por Gomes et al.⁵⁰ (2009). Os espécimes, em grupos de cinco, foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução fisiológica estéril (Figura 25) e levados para autoclave por 20 min, a 121°C. Após esterilização, os espécimes foram colocados em tubos individuais contendo 5 mL de caldo BHI e incubados (37°C/48 h) para comprovação de esterilidade (Figura 26).



Figura 25: Tubos de ensaio com raízes em soro fisiológico.



Figura 26: Comprovação da esterilidade.

4.9.3 Contaminação dos espécimes

Os espécimes previamente preparados e esterilizados foram transferidos para suspensões de *E. faecalis* previamente padronizadas, sendo cinco espécimes em cada tubo, perfazendo um total de 6 tubos e 30 espécimes (Figura 27).

Os tubos contendo os espécimes foram homogeneizados em aparelho Vortex (Quimis Q220A, Diadema, SP-Brasil) e incubados a 37°C/7 dias (Figura 28). A cada dois dias, e dentro da câmara de fluxo laminar, 2,0 mL do caldo contaminado foram substituídos por 2,0 mL de caldo fresco evitando assim a saturação do meio (Figura 29).

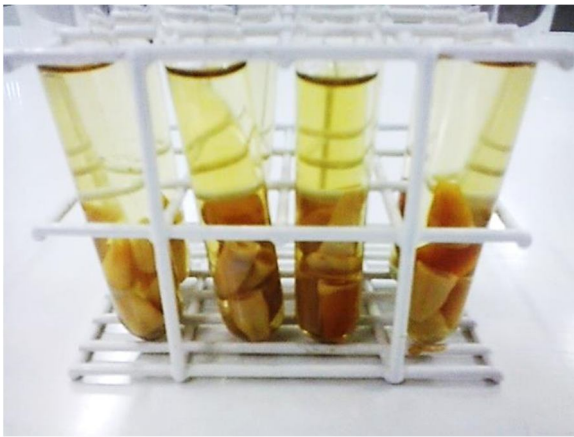


Figura 27: Espécimes em suspensão.

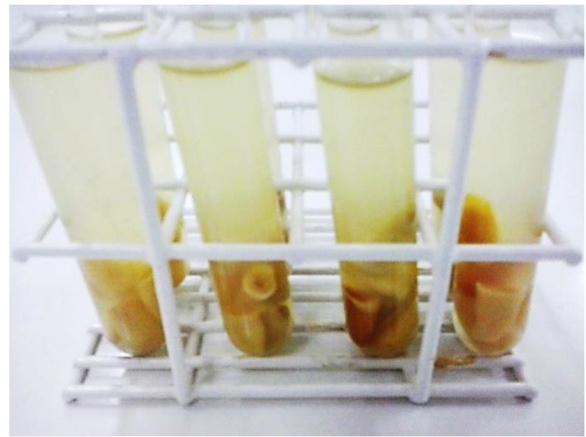


Figura 28: Contaminação após 7 dias.



Figura 29: Substituição de caldo BHI a cada dois dias em câmara de fluxo laminar.

4.9.4 Coleta microbiológica inicial (coleta 1)

Após a contaminação e sempre dentro da câmara de fluxo laminar, os espécimes foram dispostos em uma plataforma de aço inoxidável estéril (Figura 30), de modo que seu longo eixo permanecesse alinhado verticalmente, onde cada raiz foi irrigada internamente com 1,0 mL de solução fisiológica estéril e a seguir foram coletadas as primeiras amostras microbiológicas dos canais radiculares contaminados. Primeiramente, foram utilizados tantos cones de papel absorvente (estéreis) quantos foram necessários para absorver o líquido do canal, porém mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel #25 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, RJ-Brasil) que foi inserido no comprimento total do canal, permanecendo 1 min (Figura 31). A seguir, o último cone foi transferido individualmente para tubos estéreis tipo eppendorf contendo 1,0 mL de solução fisiológica (Figura 32). Os tubos foram agitados em aparelho Vortex por 1 minuto e as suspensões obtidas foram diluídas em série 1/10, 1/100 em solução fisiológica estéril. Cem microlitros da diluição 10^{-2} foram semeados em duplicata, com o auxílio de um *swab*, em ágar BHI e incubados a 37°C/48 h (Figura 33). Após o período de incubação, foi feita a contagem de colônias de microorganismos presentes nas placas, determinando-se assim o número de ufc/mL recuperado (Figura 42). Após a coleta 1, foi realizado o preparo químico mecânico (PQM) dos condutos radiculares dos espécimes, como descrito a seguir.



Figura 30: Espécimes na plataforma de aço.



Figura 31: Secagem com cone de papel.



Figura 32: Transferência dos cones de papel para tubos tipo ependorf.



Figura 33: Semeadura das suspensões em ágar BHI.



Figura 34: Contagem de ufc/mL.

4.9.5 Preparo químico-mecânico (PQM) e irrigação

Foi feito o PQM por meio de da técnica utilizada por Atila-Pektas⁴⁹ (2012). A patência apical dos condutos foi avaliada com uma lima K #10. As raízes, seguindo a sequência utilizada na fase anterior e possibilitando que a coleta 2 se relacionasse com a coleta 1, foram instrumentadas utilizando o sistema rotatório ProTaper (Dentsply Ind. e Com. Ltda, RJ-Brasil), conforme a técnica coroa-ápice, com o auxílio do motor elétrico com controle de torque X-SMART (Dentsply Ind. e Com. Ltda, RJ- Brasil) e de acordo com as instruções do fabricante: sequência S1-S2-F1-F2-F3 a 300 rpm (Figura 35). A função auto-reverso foi acionada. Foram utilizados 0,5 mL da substância auxiliar em gel específica para cada grupo de 10 dentes (*P. granatum*, clorexidina ou carbopol) antes de cada lima. Todos os grupos, após cada lima, foram irrigados com 1,0 mL de solução fisiológica estéril. A preparação dos condutos radiculares foi finalizada com o instrumento ProTaper F3. Após a última lima (F3) e depois da irrigação com o último mL de solução fisiológica estéril, os espécimes receberam aplicação de EDTA 17% por 5 min, para remoção de smear layer, seguido de 5 mL de soro fisiológico. Neste momento, os espécimes que foram instrumentados com gel de clorexidina receberam aplicação de solução de Tween-80 a 0,5% + lecitina de soja a 0,07%, solução neutralizadora específica da clorexidina, por 1 min, a fim de se evitar sua ação residual nas coletas microbiológicas. Por fim, 1,0 mL de soro fisiológico foi utilizado para irrigação final.

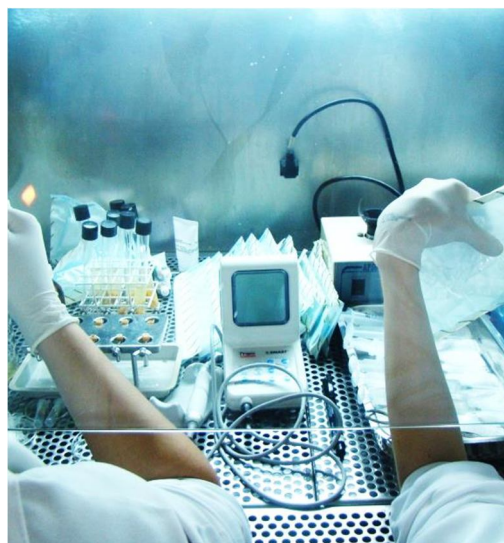


Figura 35: Instrumentação com sistema rotatório.

4.9.6 Coleta microbiológica após PQM (coleta 2)

Para esta coleta, primeiramente foram utilizados tantos cones de papel (estéreis) quantos foram necessários para absorver a solução fisiológica estéril utilizada para irrigação final do canal, porém, mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel #30 que foi inserido no comprimento total do canal preparado (15,0 mm) permanecendo 1 min, cone este que foi usado para a análise microbiológica, sendo processado como já descrito para a coleta 1.

4.9.7 Medicação intracanal (coleta 3)

Após a coleta 2, seguindo a sequência utilizada na coleta anterior e possibilitando que a coleta 3 se relacionasse com as coletas 1 e 2, as raízes foram mantidas em seus respectivos grupos experimentais para o preenchimento do canal. As substâncias usadas para o preenchimento, como medicações intracanal, foram as mesmas substâncias auxiliares em gel utilizadas durante o PQM, ou seja, gel de *P. granatum* veiculado em carbopol, gel de carbopol como controle negativo e gel de clorexidina a 2% veiculado em hidroxietilcelulose como controle positivo. Após o preenchimento total do canal, os espécimes foram fixados verticalmente em placas de 24 poços de fundo plano (Corning Cell Culture, Corning, EUA), contendo cera previamente desinfetada com NaOCl 5,25% por 1 min, e este neutralizado com SF estéril por mais 1 min, no fundo de cada poço (Figura 36). O orifício de entrada do canal foi selado também com cera utilidade. Os poços foram preenchidos com caldo BHI até a superfície dos espécimes, foi colocada uma gaze estéril umedecida em solução fisiológica estéril e a placa tampada e vedada (papel filme) para ser levada à estufa a 36°C/7 dias (Figura 37). Após o período de incubação e em ambiente estéril, todos os grupos receberam irrigação com 5 mL de solução fisiológica estéril e então foi realizada a terceira coleta microbiológica, seguindo os procedimentos utilizados para a coleta 2.

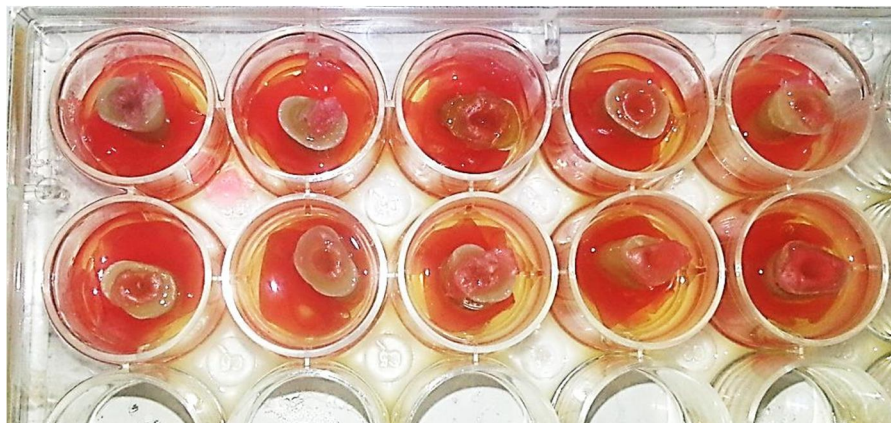


Figura 36: Fixação dos espécimes em placas de 24 poços com fundo plano.



Figura 37: Placas vedadas para incubação.

4.10 ANÁLISE DE TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO (BRINE-SHRIMP, *Artemia salina*)

4.10.1 Ecloração dos ovos

Foi utilizada uma adaptação do método de Meyer et al.⁵¹ (1982). Um recipiente com capacidade para 2 litros teve uma de suas faces coberta por papel plástico

preto e foi preenchido com água salgada artificial (40 g sal marinho/L água destilada). Foram adicionados 50 mg de ovos de *A. salina* (Carolina Biological Supply Company, Burlington, USA - Figura 38) e o recipiente recebeu iluminação constante, durante 48 h (Figura 39).



Figura 38: Ovos de *A. salina*.



Figura 39: Eclosão dos ovos.

4.10.2 Determinação da letalidade

Foram preparadas, em triplicata, 5 mL de diluições seriadas do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* (1 a 0,01 g/mL), de solução de álcool e glicerina, de solução alcoólica, de dicromato de potássio a 20% - $K_2Cr_2O_7$ (controle positivo) e de solução salina tampão fosfato em água salgada artificial (controle negativo, Figura 40). A quantidade em mg/mL de cada substância testada está identificada na Tabela 1. Também foi testado o digluconato de clorexidina 2%, sem realização de diluição seriada. Foram pipetados 10 náuplios fototrópicos para cada tubo de ensaio (Figura 41), com pipetas de Pasteur e auxílio de contador de colônias e vidro de relógio. Os tubos então receberam iluminação constante por 24h (Figura 42). Os náuplios mortos, não móveis durante 10 segundos de observação, foram contados (Figura 43). A toxicidade foi estimada pela concentração de solvente com 50% dos animais mortos (LC_{50}), estimada após 24 h. A tolerabilidade máxima (máxima concentração em que mais de 50% dos animais permanecem vivos) para o dicromato de potássio ocorre em concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e a LC_{50} a 11,35 $\mu\text{g/mL}$.⁵²

Tabela 1: Concentração em mg/mL das substâncias testadas de acordo com a concentração em porcentagem utilizada para o teste de toxicidade.

Diluição	0	1	2	3	4	5	6
Substância	100%	50%	25%	12,5%	6,2%	3,1%	1,5%
Extrato de <i>P. granatum</i>	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,6
Glicerina (com álcool)	10	5	2,5	1,2	0,6	0,3	0,1
Álcool (com glicerina)	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8
Solução alcoólica	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8

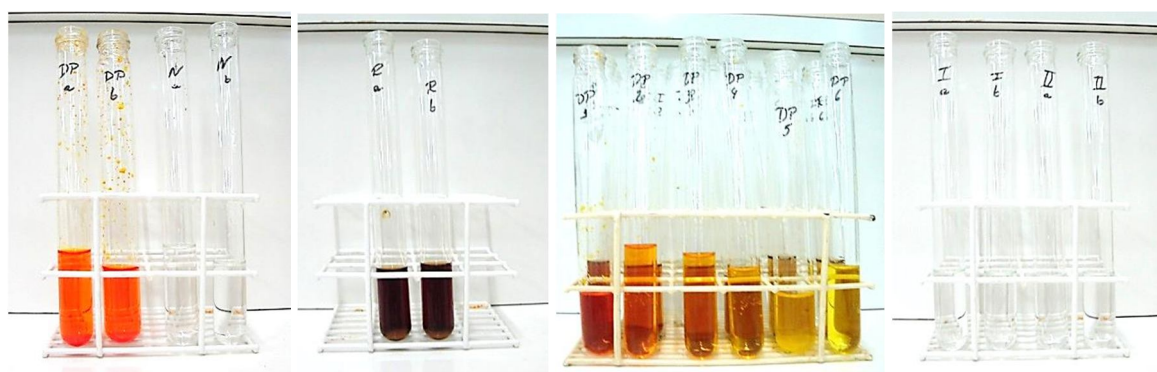


Figura 40: Diluições seriadas das substâncias testadas quanto a letalidade em microcrustáceo.

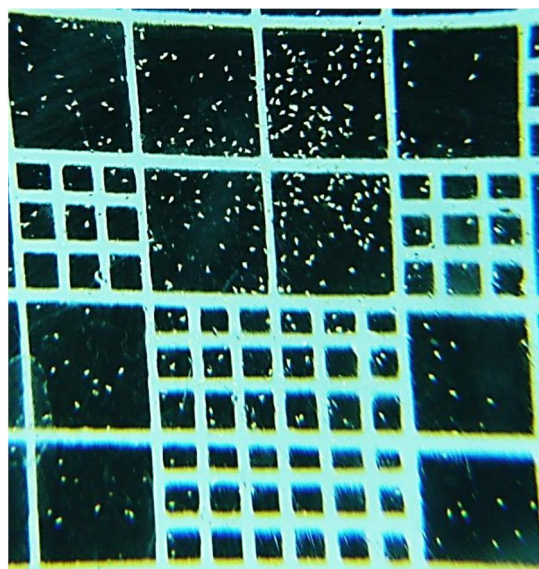


Figura 41: Náuplios fototrópicos, vistos em aparelho contador de colônias.

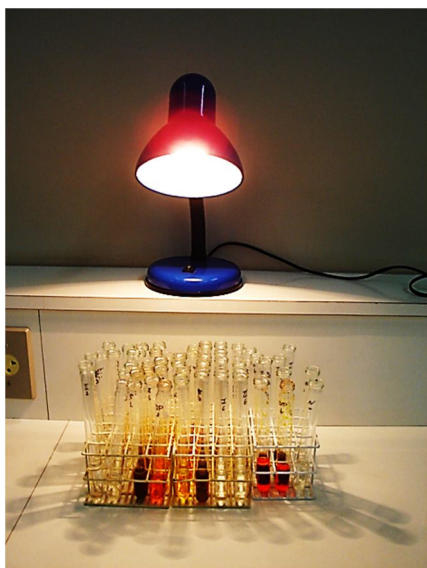


Figura 42: Iluminação por 24 h.



Figura 43: Contagem de náuplios mortos.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados primários de cada uma das aferições realizadas nos diferentes testes do presente estudo podem ser visualizados nos Apêndices A a D, bem como as estatísticas descritivas e os testes de normalidade (Apêndices E a I) e as estatísticas inferenciais (Apêndices J a S).

4.11.1 Ação antimicrobiana do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L.

Os resultados para o micro-organismo *S. aureus* foram transformados ao quadrado. As medidas dos halos de inibição em mm de todas as bactérias foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk por meio do programa BioStat 5.0. Para a comparação das medidas dos halos de inibição entre as diferentes concentrações foi realizado o teste ANOVA com pós-teste Scheffé por meio de do programa SPSS versão 5.0.

4.11.2 Concentração inibitória mínima do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L.

Foi realizada a verificação visual do crescimento microbiano, sendo as concentrações inibitórias expressas em g/mL e o crescimento microbiano por meio da indicação da ausência ou presença de crescimento visível.

4.11.3 Concentração bactericida mínima do extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L.

Após plaqueamento das alíquotas dos poços utilizados para o teste de concentração inibitória mínima, foi realizada a verificação visual do crescimento microbiano. As concentrações bactericidas foram expressas em mg/mL e o crescimento microbiano por meio da indicação da ausência ou presença de crescimento visível.

4.11.4 Ação antimicrobiana dos géis por meio de da difusão em ágar

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk por meio do programa BioStat 5.0. Para a comparação das medidas dos halos de inibição em mm entre as diferentes substâncias foi realizado o teste ANOVA com pós-teste Scheffe por meio de do programa SPSS versão 17.0.0.

4.11.5 Ação antimicrobiana dos géis em dentina infectada

Foram realizados os testes de normalidade D'Agostino e Lilliefors, por meio do programa BioStat 5.0. Demais testes foram realizados por meio de do programa SPSS versão 17.0.0. A diferença da média das unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/mL) entre os tempos experimentais para cada substância, com pareamento de dentes, foi verificada pelo teste Friedman. A diferença das médias das ufc/mL entre as substâncias para cada tempo experimental foi verificada pelo teste Kruskal-Wallis. A comparação das médias das ufc/mL entre os tempos experimentais par-a-par para cada substância, com pareamento de

dentes, foi verificada pelo teste Wilcoxon. Por último, a diferença par-a-par das médias das ufc/mL entre as substâncias para cada tempo experimental foi verificada pelo teste Mann-Whitney.

4.11.6 Análise de toxicidade do extrato hidroglicólico de *Punica granatum* L. por meio de da determinação de letalidade em microcrustáceo (Brine-Shrimp, *Artemia salina*)

As contagens de náuplios vivos foram submetidas aos testes de normalidade D'Agostino e Lilliefors por meio do programa BioStat 5.0. O número de náuplios vivos foi apresentado por meio de um gráfico de Box-plot, produzido pelo programa SPSS versão 17.0.0. A taxa de mortalidade dos microcrustáceos foi calculada pela fórmula:

$$\text{Taxa de mortalidade (\%)} = (\text{náuplios mortos} / \text{total de náuplios}) \times 100$$

Foi realizada a correção da taxa de mortalidade com base na mortalidade observada nos controles negativos utilizando-se a fórmula de Abbot, na qual pi corresponde à taxa de mortalidade observada e C à taxa de mortalidade natural:

$$P = (pi - C) / (1 - C)$$

O valor da concentração letal média (LC₅₀) foi calculado por meio de da equação de reta gerada pela regressão linear considerando o gráfico taxa de mortalidade corrigida pela fórmula de Abbot x concentrações testadas⁵², pelo programa SPSS versão 17.0.0. Os valores de referência para a LC₅₀ seguem a Classificação de Pesticidas recomendada pela Organização Mundial da Saúde - OMS (2004)⁵³, conforme Quadro 1.

Quadro 1: Classificação de Pesticidas recomendada pela OMS, 2004⁵³.

Classe	LC ₅₀ (mg/kg = ug/g = mg/L = ug/mL = ppm)			
	Oral		Dermal	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia Extremamente tóxico	5 ou menos	20 ou menos	10 ou menos	40 ou menos
Ib Altamente tóxico	5 a 50	20 a 200	10 a 100	40 a 400
II Moderadamente tóxico	50 a 500	200 a 2000	100 a 1000	400 a 4000
III Levemente tóxico	Acima de 500	Acima de 2000	Acima de 1000	Acima de 4000

Os termos “sólidos” e “líquidos” referem-se ao estado físico do ingrediente ativo classificado.

Valores de LC₅₀ oral são usados, mas se o valor de LC₅₀ dermal colocar um dado produto em uma classe de maior periculosidade, esse valor é utilizado como referência para a classificação. **Fonte:** OMS, 2004.⁵³

5 RESULTADOS

5.1 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A média dos halos de inibição para cada bactéria em cada concentração de extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* e de digluconato de clorexidina está representada na Tabela 2. A comparação entre as médias obtidas para o extrato e as médias obtidas para o digluconato de clorexidina 0,12% está expressa nas Tabelas 3 e 4. A comparação entre as médias do extrato e as médias do digluconato de clorexidina 2% encontra-se nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 2: Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* sobre as bactérias testadas.

Bactérias	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	Cl 0,12%	Cl 2%
<i>P. aeruginosa</i>	15	13	13	11	10	10	17
<i>Klebsiella sp.</i>	16	15	15	12	0	13	20
<i>E. coli</i>	18	17	14	13	0	12	20
<i>S. aureus</i>	19	18	18	15	11	16	21
<i>E. faecalis</i>	20	19	18	14	11	13	21

Controle negativo com soro fisiológico.

Cl = clorexidina.

Tabela 3: Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* que tiveram ação estatisticamente semelhante à ação do digluconato de clorexidina 0,12 % sobre as bactérias testadas.

Bactérias	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	Cl 0,12%	p
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	11	10	10	p>0,05
<i>Klebsiella sp.</i>	-	15	15	12	-	13	p>0,05
<i>E. coli</i>	-	-	14	13	-	12	p>0,05
<i>S. aureus</i>	19	18	18	15	-	16	p>0,05
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	14	11	13	p>0,05

Controle negativo com soro fisiológico.

Cl = clorexidina.

Tabela 4: Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* que tiveram ação estatisticamente diferente à ação do digluconato de clorexidina 0,12 % sobre as bactérias testadas.

Bactérias	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	Cl 0,12%	p
<i>P. aeruginosa</i>	15	13	13	-	-	10	p<0,05
<i>Klebsiella sp.</i>	16	-	-	-	0	13	p<0,05
<i>E. coli</i>	18	17	-	-	0	12	p<0,05
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	11	16	p<0,05
<i>E. faecalis</i>	20	19	18	-	-	13	p<0,05

Controle negativo com soro fisiológico.

Cl = clorexidina.

Tabela 5: Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* que tiveram ação estatisticamente semelhante à ação do digluconato de clorexidina 2 % sobre as bactérias testadas.

Bactérias	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	Cl 2%	p
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	17	p>0,05
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-	-	-	-	20	p>0,05
<i>E. coli</i>	18	-	-	-	-	20	p>0,05
<i>S. aureus</i>	19	18	-	-	-	21	p>0,05
<i>E. faecalis</i>	20	19	18	-	-	21	p>0,05

Controle negativo com soro fisiológico.

Cl = clorexidina.

Tabela 6: Média dos halos de inibição (mm) do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* que tiveram ação estatisticamente diferente à ação do digluconato de clorexidina 2 % sobre as bactérias testadas.

Bactérias	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	Cl 2%	p
<i>P. aeruginosa</i>	15	13	13	11	10	17	p<0,05
<i>Klebsiella sp.</i>	16	15	15	12	0	20	p<0,05
<i>E. coli</i>	-	17	14	13	0	20	p<0,05
<i>S. aureus</i>	-	-	18	15	11	21	p<0,05
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	14	11	21	p<0,05

Controle negativo com soro fisiológico.

Cl = clorexidina.

Por meio de verificação visual, pôde-se constatar que os halos de inibição sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* sofreram redução de diâmetro após incubação prolongada, configurando a atividade do extrato de *P. granatum* como bacteriostática sobre estes micro-organismos, por meio de do teste de difusão em ágar (Figura 44).

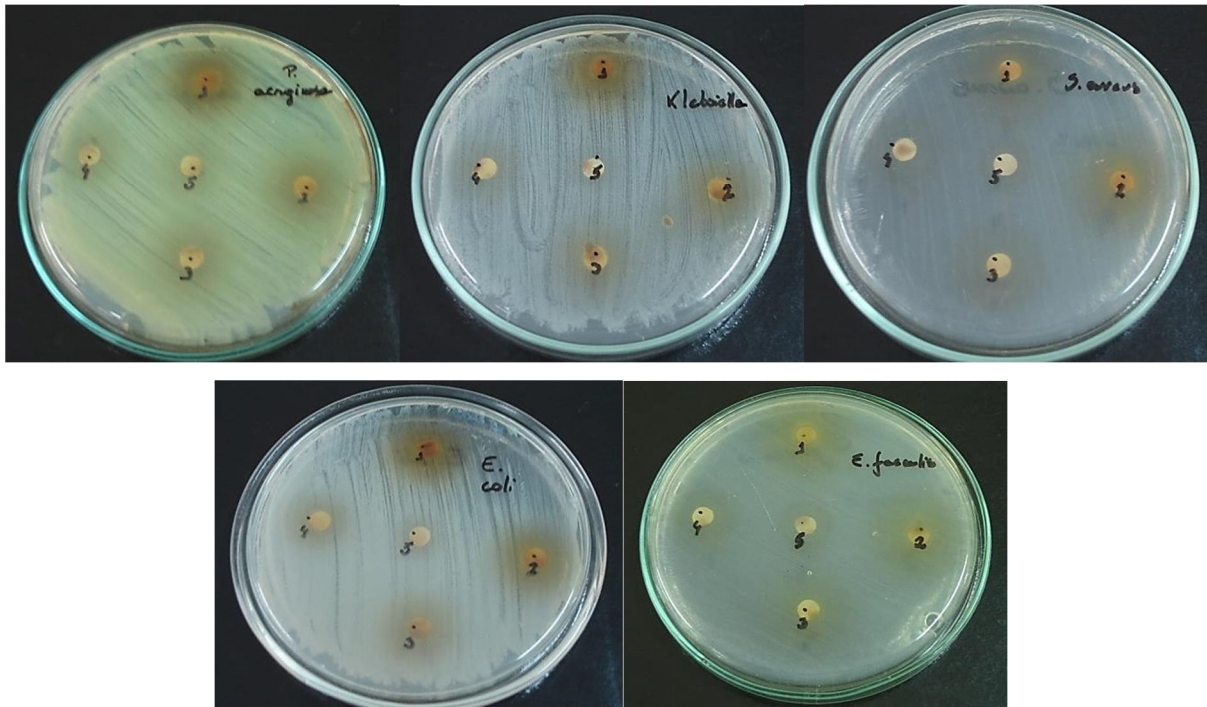


Figura 44: Halos de inibição do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum*.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE *Enterococcus faecalis*

A análise visual do teste de concentração inibitória mínima do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* está expresso na Figura 45. O crescimento microbiano está expresso na Tabela 7 por meio de da indicação da ausência (-) ou presença (+) de crescimento visível.



Figura 45: Placa de 96 poços com fundo em U após incubação.

Tabela 7: Inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis* em diferentes concentrações das substâncias testadas.

Substância teste	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	0,03g/ mL	0,01g/ mL
<i>P. granatum</i>	-	-	-	-	-	-	-
Álcool/Glicerina	-	-	+	+	+	+	+
Álcool	-	+	+	+	+	+	+

Clorexidina 0,12% = crescimento -

Clorexidina 2% = crescimento -

Ausência de substância = crescimento +

5.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L.

Devido à dificuldade de avaliação visual provocada pela coloração marrom do extrato de *P. granatum* e pelo precipitado formado pela inserção da clorexidina, os resultados negativos foram plaqueados em ágar BHI para comprovação da ausência de crescimento (Figura 46). O crescimento microbiano está expresso na Tabela 8 por meio de a indicação da ausência (-) ou presença (+) de crescimento visível.

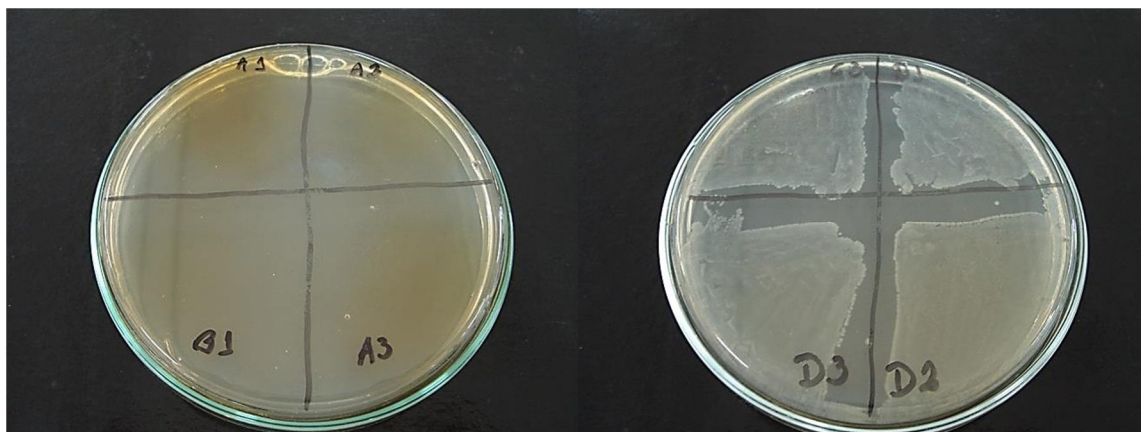


Figura 46: Plaqueamento das alíquotas correspondentes aos poços A1, A2, A3, B1, C3, D1, D2 e D3.

Tabela 8: Inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis* em diferentes concentrações das substâncias testadas, após confirmação da ausência de crescimento por plaqueamento em ágar.

Substância teste	1g/ mL	0,5g/ mL	0,25g/ mL	0,12g/ mL	0,06g/ mL	0,03g/ mL	0,01g/ mL
<i>P. granatum</i>	-	-	+	+	+	+	+
Álcool/Glicerina	+	+	+	+	+	+	+
Álcool	+	+	+	+	+	+	+

Clorexidina 0,12% = crescimento -

Clorexidina 2% = crescimento -

Ausência de substância = crescimento +

Após comprovação da ausência de crescimento e considerando que o extrato de *P. granatum* apresenta-se a 1 g/mL, a MIC do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* sobre o *E. faecalis* foi de 0,5 g/mL (ou 500 mg/mL). A solução de glicerina e álcool e a solução alcoólica não causaram inibição da cepa.

5.4 AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os halos de inibição obtidos com o gel do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 0,5 g/mL, com o gel de digluconato de clorexidina a 2%, com o gel de carbopol e com o gel de hidroxietilcelulose estão demonstrados na Figura 47. Não houve formação de halo de inibição para os controles negativos com gel de carbopol e com

gel de hidroxietilcelulose. A comparação entre as substâncias testadas esta expressa na Tabela 9.

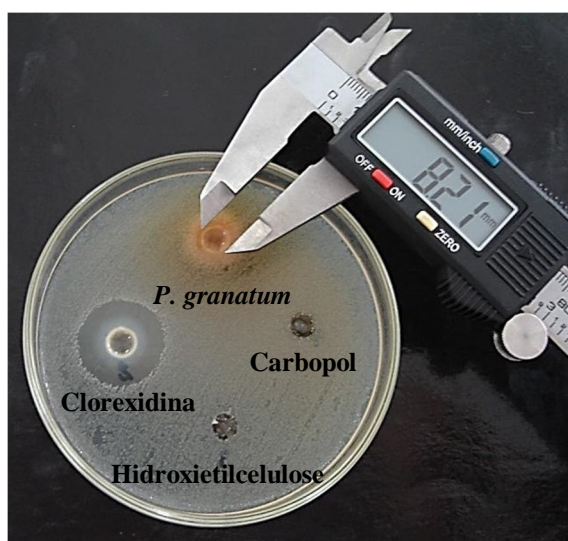


Figura 47: Halos de inibição do teste de difusão em ágar utilizando-se os géis.

Tabela 9: Média dos halos de inibição (mm) dos géis testados sobre *Enterococcus faecalis*.

Géis	Média Halos de Inibição
<i>P. granatum</i> 50%	8
Clorexidina 2%	21
Significância	0,000

Diferenças significativas entre o gel do extrato hidroglicólico de *P. granatum* e os controles negativos ($p=0,000$).

Diferenças significativas entre a clorexidina e os controles negativos ($p=0,000$).

5.5 AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

Considerando as substâncias entre si, dentro de cada tempo experimental (colunas), os três géis apresentaram-se semelhantes no momento da coleta inicial e após instrumentação, sendo diferentes após os 7 dias de medicação intracanal (Tabela 10).

A instrumentação reduziu a contagem de ufc/mL (Figura 48) quando utilizado o gel de carbopol (redução de 94,8%, $p=0,005$), porém, a contagem voltou a ser semelhante à inicial após utilização do mesmo como medicação intracanal ($p=0,386$). Para o gel com o extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum*, a contagem de ufc/mL reduziu após instrumentação (redução de 96%, $p=0,005$), permanecendo reduzida após seu uso como medicação intracanal ($p=0,047$), mantendo-se 65% menor do que a contagem inicial e provocando menor recontaminação após instrumentação, mais precisamente 2,4 vezes menor em comparação com a utilização do gel de carbopol (aumento na contagem de ufc/mL de

1900% com o gel de carbopol e de 775% com o gel de *P. granatum*). Com a utilização do gel de digluconato de clorexidina 2%, houve redução da contagem de ufc/mL após instrumentação (redução de 98%, $p=0,005$) e maior redução após seu uso como medicação intracanal (99,8%, $p=0,005$).

Tabela 10: Média das unidades formadoras de colônia de *Enterococcus faecalis* antes da instrumentação (coleta 1), após instrumentação endodôntica (coleta 2) e após medicação intracanal (coleta 3) obtidas com a utilização dos géis.

Géis	Inicial	Após Instrumentação	Medicação intracanal	Significância
Carbopol	23.10 ³ (±13.10 ³) a,A	1,2.10 ³ (±1,6.10 ³) b,B	24.10 ³ (±29.10 ³) a,C	0,000
<i>P. granatum</i> 50%	40.10 ³ (±21.10 ³) c,A	1,6.10 ³ (±2,3.10 ³) d,B	14.10 ³ (±25.10 ³) d,D	0,002
Clorexidina 2%	41.10 ³ (±25.10 ³) e,A	0,7.10 ³ (±0,8.10 ³) f,B	0,07.10 ³ (±0,1.10 ³) g,E	0,000
Significância	0,096	0,727	0,000	

Letras minúsculas: Comparação par-a-par entre linhas, com pareamento de dentes (teste Wilcoxon).

Letras maiúsculas: Comparação par-a-par entre colunas (teste Mann-Whitney).

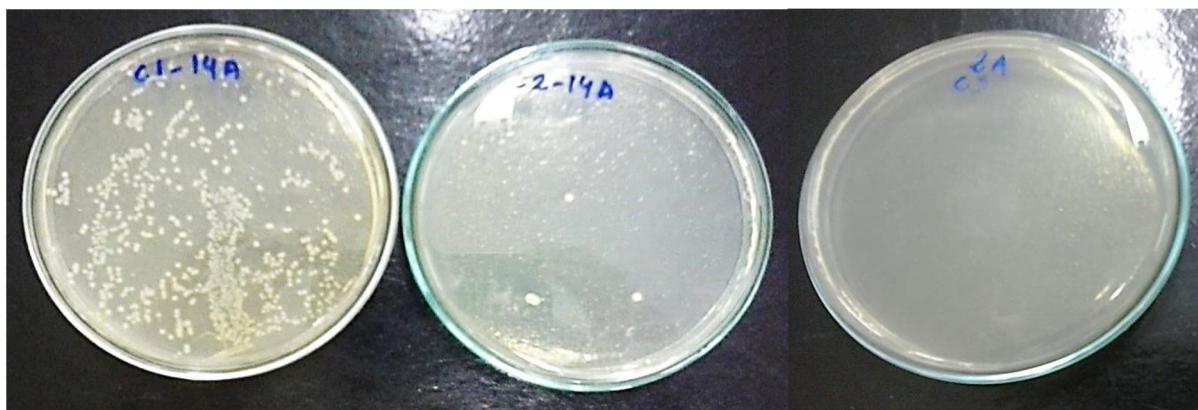


Figura 48: Exemplo de contagem de ufc/mL inicial, após instrumentação e após medicação intracanal.

5.6 ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

O número de náuplios vivos de *Artemia salina* foi expresso por meio de gráficos *Box Plot* (Figura 49). A mediana de náuplios vivos para a água salgada artificial foi 9,5, para o extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 3,1% foi 4, para o extrato

hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 1,5% foi 6,5, para a solução de álcool e glicerina a 6,2% foi 6, para a solução de álcool e glicerina a 3,1% foi 8, para a solução de álcool e glicerina a 1,5% foi 9,5, para a solução alcoólica a 6,2% foi 5, para a solução alcoólica a 3,1% foi 8, para a solução alcoólica 1,5% não houve variação e 9 náuplios permaneceram vivos, para o dicromato de potássio em todas as concentrações e para o digluconato de clorexidina a 2% nenhum náuplio sobreviveu. As taxas de mortalidade observadas encontram-se na Tabela 11 e nas Figuras 50 a 53.

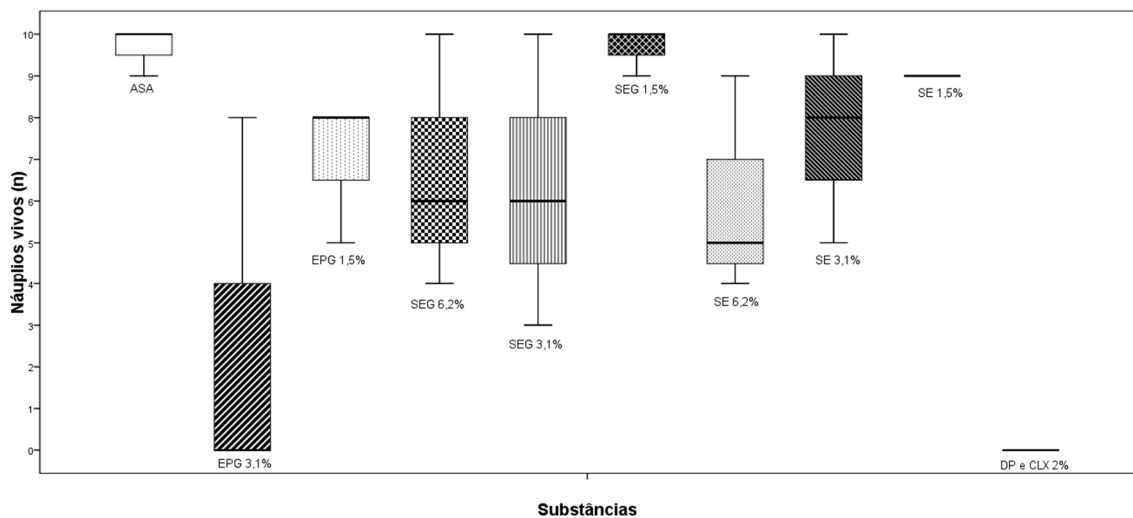


Figura 49: Número de náuplios vivos de *Artemia salina* em diferentes concentrações das substâncias testadas após 24 h. ASA: Água salgada artificial, EPG: Extrato de *P. granatum*, SEG: Solução de etanol e glicerina, SE: Solução de etanol, DP: Dicromato de potássio e CLX: Digluconato de clorexidina.

Tabela 11: Taxa de mortalidade da *Artemia salina* em diferentes concentrações das substâncias testadas (correção pela Fórmula de Abbot).

Substância	100%	50%	25%	12,5%	6,2%	3,1%	1,5%
Extrato de <i>P. granatum</i>	42	42	42	42	42	30,3	11,6
Glicerina (com álcool)	42	42	42	42	13	14,5	0
Álcool (com glicerina)	42	42	42	42	13	14,5	0
Solução alcoólica	42	42	42	42	15,9	8,7	2,9

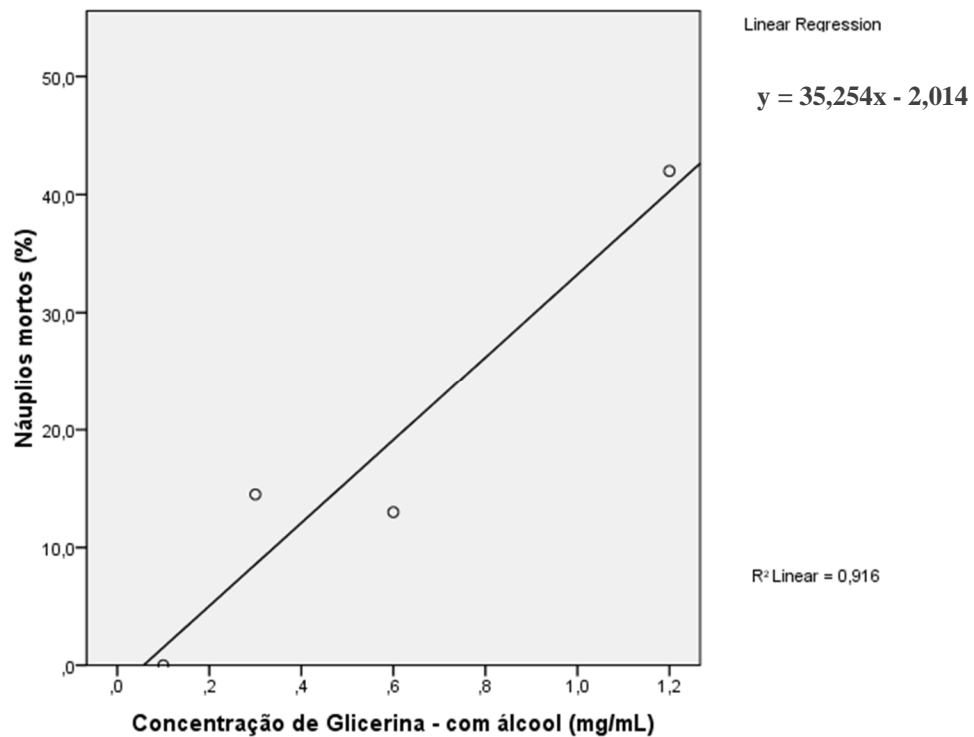


Figura 50: Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de glicerina (mg/mL) da solução de álcool com glicerina.



Figura 51: Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de álcool (mg/mL) da solução de álcool com glicerina.

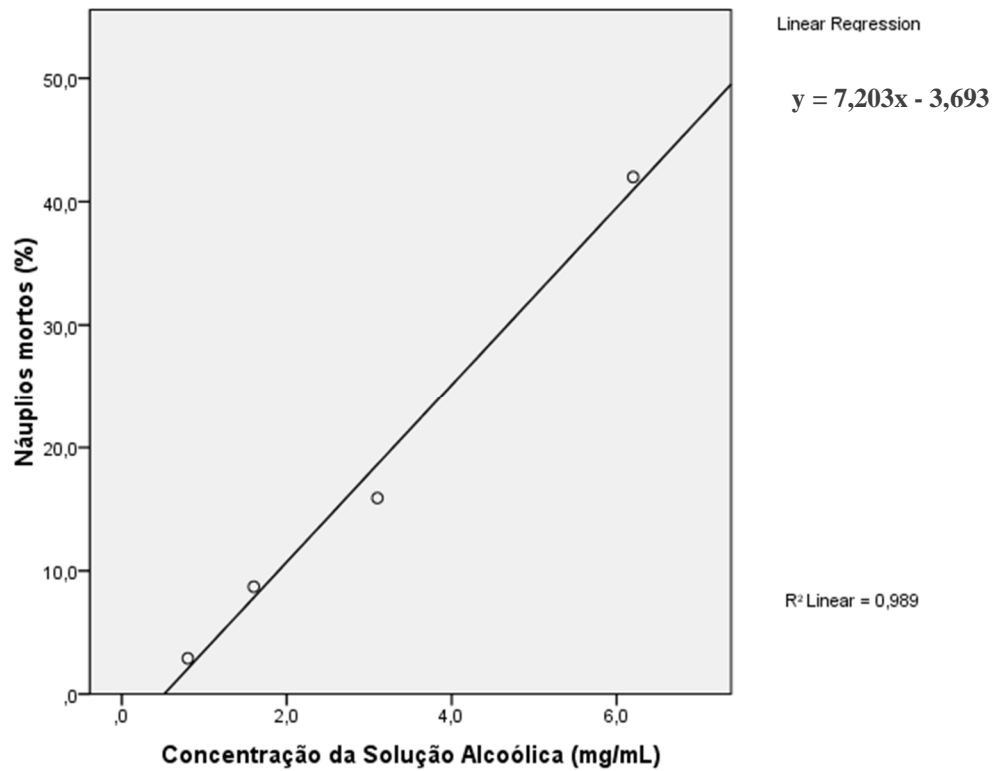


Figura 52: Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de álcool (mg/mL) da solução alcoólica.

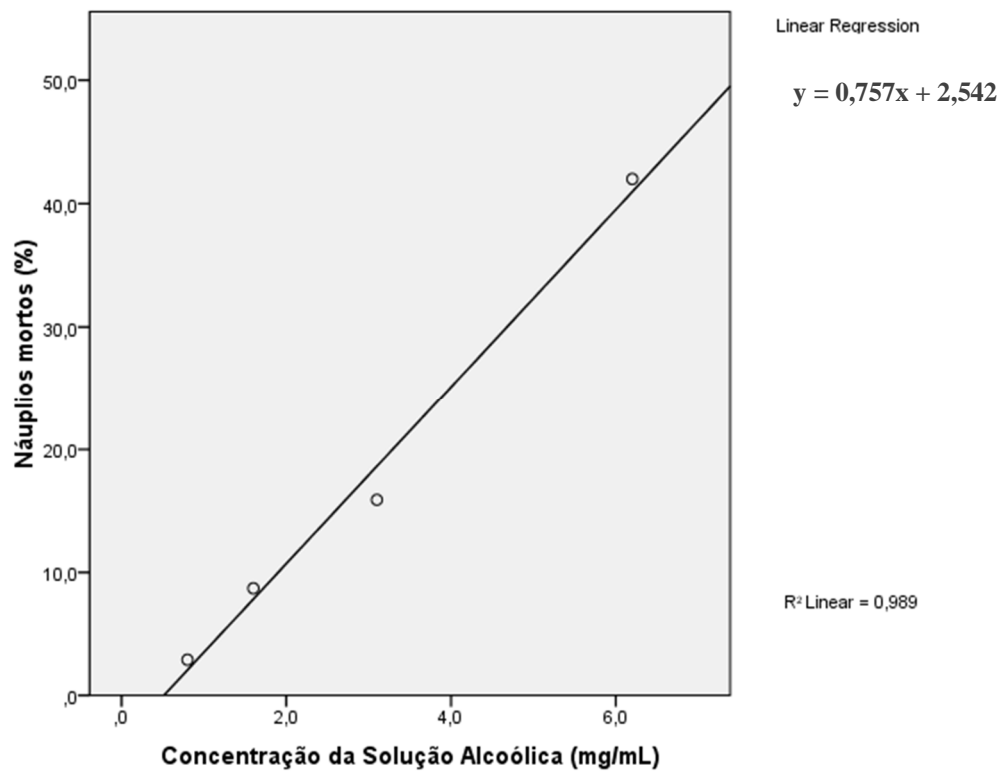


Figura 53: Reta de regressão linear considerando o número de náuplios mortos (% corrigida pela Fórmula de Abbot) e a concentração de extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* (mg/mL).

O extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* e os líquidos extratores apresentaram comportamento semelhante em relação à toxicidade sobre *Artemia salina* nas concentrações de 100 a 12,5%, inclusive no que se refere ao papel da glicerina. O digluconato de clorexidina 2% e o dicromato de potássio causaram a morte de todos os náuplios. A LC₅₀ para as substâncias testadas está representada na Tabela 12.

Tabela 12: Concentração letal média (LC₅₀) das substâncias testadas, obtida por meio de da equação de reta da regressão linear considerando o gráfico taxa de mortalidade corrigida pela fórmula de Abbot x concentrações testadas e comparação com a classificação com base nos valores de referência da OMS, 2004⁵³ (LT - Levemente tóxico).

Substância	LC₅₀ (mg/mL)	LC₅₀ (ppm)	Uso Oral Líquidos	Uso Oral Sólidos
Extrato de <i>P. granatum</i>	62,7	62700	LT	LT
Glicerina (com álcool)	1,5	1500	-	LT
Álcool (com glicerina)	7,5	7500	LT	LT
Solução alcoólica	7,4	7400	LT	LT

6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o extrato hidroglicólico de pericarpo de *Punica granatum* L. possui ação bacteriostática sobre *Pseudomonas aeruginosa*, halos de inibição de 10 a 15 mm, *Klebsiella* sp. (12 a 16 mm), *Escherichia coli* (13 a 18 mm), *Staphylococcus aureus* (11 a 19 mm) e *Enterococcus faecalis* (11 a 20 mm), com comprovada ação bactericida sobre *E. faecalis*, semelhante à ação do digluconato de clorexidina 2% nas concentrações de extrato 1 a 0,25 g/mL e superior à ação do digluconato de clorexidina a 0,12% quando utilizadas as mesmas concentrações de extrato. Como substância auxiliar, o gel do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 0,5 g/mL teve ação semelhante (redução de 96% da contaminação inicial) ao gel de digluconato de clorexidina 2% (redução de 98%) e ao gel de carbopol (redução de 94,8%) em relação ao efeito do preparo químico-mecânico, indicando que a grande responsável pela limpeza do canal parece ser a própria instrumentação, independentemente da substância auxiliar que se utilize. No entanto, o gel do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 0,5 g/mL pode ser uma proposta promissora como medicação intracanal uma vez que resultou em 65% menos contaminação por *E. faecalis* após o período de 7 dias. Além disso, a classificação como líquido de uso oral levemente tóxico após teste de mortalidade de microcrustáceos sugere sua biocompatibilidade.

A análise da ação antimicrobiana dos extratos de *P. granatum* sobre bactérias e fungos tem apresentado resultados diversos.^{29, 30, 32} Sobre *P. aeruginosa* os halos de inibição variam de 10 a 20 mm,^{23, 29, 30, 32, 34} sobre *Klebsiella* sp. variam de 13 a 18 mm,^{29, 30, 33} sobre *Escherichia coli* variam de 12 a 26 mm^{23, 29, 30, 32, 34} e sobre *S. aureus* variam de 12 a 40 mm,^{23, 29, 30, 32, 33} semelhante aos valores encontrados por este estudo. A escolha de um extrato alcoólico se deu devido ao extrato metanólico da casca de *P. granatum* possuir maior atividade que seu extrato aquoso, mantendo-a após esterilizado (121° C/15 min)²⁹, ou seja, apresentando termoestabilidade. A atividade bacteriostática de extratos de *P. granatum* sobre *E. faecalis*, visualizada por halos de inibição que desaparecem após incubação prolongada, também foi observada por Al-Zoreky, 2009,²⁹ e é atribuída à inibição de processos fisiológicos que são posteriormente reativados. Assim, a investigação de sua ação bactericida se faz necessária, como a realizada neste estudo por meio do teste de concentração bactericida mínima.

A capacidade bactericida do extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* foi confirmada pelo plaqueamento das alíquotas utilizadas no teste de concentração

inibitória mínima, por meio de da erradicação completa deste micro-organismo nas concentrações de extrato de 1 g/mL e 0,5 g/mL. Já a atividade de inibição de 8 mm do gel com extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 0,5 g/mL sobre *E. faecalis* se mostrou constante após incubação prolongada, sendo semelhante a estudos que demonstram halos de inibição de 8³³ e 9 mm,^{31, 34} apesar da literatura demonstrar variabilidade entre 8 e 24 mm.^{23, 31, 33, 34}

No que se refere à ação de *P. granatum* especificamente sobre *E. faecalis* a literatura é limitada. Sua ação sobre a concentração inibitória mínima encontrada para *E. faecalis* variou de 30 µg/mL a 50 mg/mL,^{23, 31} sendo menor que a concentração obtida neste estudo, de 500 mg/mL. Esta variabilidade de sua atividade pode ser atribuída principalmente ao veículo extrator (água, etanol, metanol, éter, glicerina) e sua capacidade de extração de constituintes antimicrobianos de *P. granatum*, havendo 26,3% em extrato metanólico, 8,2% em etílico e 0,6% em aquoso.²⁹ Por isso, a importância dos estudos explicitarem a forma de obtenção dos extratos.

Quando simulada a utilização endodôntica do gel com extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 0,5 g/mL, a semelhança entre os resultados do controle negativo, do gel com extrato de *P. granatum* e do gel com digluconato de clorexidina 2% após instrumentação ($p=0,727$) indica que o maior responsável pela limpeza do canal foi o preparo biomecânico. Além disso, a manutenção da redução de 65% do número de ufc/mL observada após utilização do gel com extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* a 0,5 g/mL como medicação intracanal durante 7 dias em relação à contagem de ufc/mL antes da instrumentação ($p=0,000$), indica que a efetividade do gel de *P. granatum* sobre *E. faecalis* durante o tratamento endodôntico parece depender do tempo de contato com as paredes do canal radicular, assim como a ação do gel com digluconato de clorexidina 2%, apresentando-se efetividade em relação à não utilização de substâncias. Apesar da atividade dos extratos de *P. granatum* contra *E. faecalis* ser conhecida, dentro de nossas buscas, o presente estudo é o primeiro explorando a utilização de substâncias a base de *P. granatum* na área da Endodontia, seja em estudos clínicos ou *in vitro*, havendo apenas dois estudos clínicos utilizando-a na veiculação em gel nas áreas de Periodontia e Prótese^{36, 37}.

Na literatura, há relato de forte efeito inibidor do extrato metanólico da casca de *P. granatum* com 1 mg/poço, sendo que a sua ação antimicrobiana pode ser correlacionada positivamente com o seu conteúdo de compostos bio-ativos.³² Cultivos com grande quantidade de ácidos e ricos em compostos fenólicos (flavonoides e taninos) e antocianinas têm uma atividade maior, sendo intimamente relacionada com sua capacidade

antioxidante, sendo por isso a *P. granatum* uma fonte útil para novos agentes antimicrobianos.^{30, 33} Seu uso milenar na medicina popular sugere que representa uma alternativa segura e econômica para o tratamento de doenças.³⁴

Na Odontologia, a *P. granatum* foi investigada clinicamente em relação à redução do sangramento gengival³⁵, no tratamento da estomatite aftosa recorrente³⁶, e da estomatite protética³⁷. Sua efetividade na redução do sangramento gengival sugere uma ação anti-inflamatória e antimicrobiana similar à da clorexidina a 0,12%, assim, pode ser utilizada como agente terapêutico adicional para restabelecimento e manutenção da saúde periodontal.³⁵ A melhora clínica em relação à estomatite aftosa recorrente inclui redução da dor das úlceras aftosas menores e melhora do tempo de cura, com as vantagens de boa adesão do tratamento pelo paciente, facilidade de utilização do gel e efeitos colaterais mínimos.³⁶ Em relação à sua ação no tratamento da estomatite protética, o sucesso foi atribuído à interferência dos polifenóis nas proteínas salivares e em algumas enzimas das bactérias orais, podendo afetar a membrana bacteriana e interferir na co-agregação³⁷, ações interessantes no que diz respeito à formação do biofilme endodôntico.

Em relação à toxicidade do fruto de *P. granatum*, a investigação da ação dos compostos fenólicos sobre as proteínas plasmáticas é importante devido à sua interação com praticamente todos os tecidos e células do organismo e sua íntima relação com o metabolismo proteico no fígado.³⁸ Estudos *in vitro* demonstram que a *P. granatum* não interfere na hemólise, mas interfere no metabolismo de proteínas, devendo seu uso ser investigado com cautela no que se refere à sua tolerabilidade, devido a sua possível relação com problemas hepáticos e renais nos casos em que não for convertida em metabólitos solúveis em água.^{30, 38} Os achados de Cerda et al. (2003)⁴⁰, em animais, indicam acúmulo de punicalgina intacta no plasma, seguindo uma cinética de saturação para atingir um equilíbrio, sendo ela a substância com maior peso molecular encontrada no plasma até agora, e demonstram que o extrato contendo punicalgina não causa variação na defesa enzimática contra espécies de reação oxidativa, não interferindo neste mecanismo químico de prevenção ao câncer. Ainda, reforçam a redução da palatabilidade provocada pela administração oral de *P. granatum* e a interferência provisória na precipitação de proteínas do trato alimentar, com inibição de enzimas digestivas e diminuição da conversão de nutrientes absorvidos, sendo este efeito posteriormente anulado.

Assim, a administração de punicalgina não provoca alterações teciduais e a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos se mantêm normais após seu uso. Testes do extrato de *P. granatum* sobre *Artemia salina* indicam ampla variabilidade de resultados,

como no estudo de Altunkaya et al. (2013), variando de 27 a 82%, sendo que a letalidade sobre microcrustáceos parece ser dose-dependente.³⁹ Considerando a eficácia antibacteriana e a natureza levemente tóxica, *P. granatum* apresentou considerável potência.³⁰ Porém, a toxicidade dos compostos inerentes a *P. granatum* ainda precisa ser melhor investigada, de forma a definir a ação de diferentes tipos e concentração das substâncias e de permitir a extrapolação dos achados para o uso em humanos.

7 CONCLUSÃO

O extrato hidroglicólico do pericarpo de *Punica granatum* L. (romã) possui efeito antimicrobiano sobre *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*, sendo classificado como levemente tóxico em microcrustáceos. O gel com o extrato hidroglicólico do pericarpo de *P. granatum* na concentração de 0,5 g/mL é efetivo contra *E. faecalis* e deve ser investigado como uma alternativa de medicação intracanal em casos de *E. faecalis* resistente, especialmente no que se refere ao seu uso como medicação intracanal na área da Endodontia.

REFERÊNCIAS

1. Garcez AS, Nunez SC, Lage-Marques JL, Hamblin MR, Ribeiro MS. Photonic real-time monitoring of bacterial reduction in root canals by genetically engineered bacteria after chemomechanical endodontic therapy. *Braz Dent J.* 2007;18(3):202-7.
2. Callahan J. Sulfuric acid for opening root-canals. *Dent Cosmos.* 1894;36(12):957-9.
3. Grossman LI. Irrigation of root canals. *J Am Dent Assoc.* 1943;30(13):1915-7.
4. Grossman LI. Endodontic treatment of pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1960;61(6):617-76.
5. Ingle JI, Zeldow BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and negative culture in endodontic therapy. *J Am Dent Assoc.* 1958;57(4):471-6.
6. Nicholls E. The efficacy of cleansing of the root canal. *Br Dent J.* 1962;112(4):167-70.
7. Stewart GG. The importance of chemomechanical preparation of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1955;8(9):993-7.
8. Mancini M, Armellini E, Casaglia A, Cerroni L, Cianconi L. A comparative study of smear layer removal and erosion in apical intraradicular dentine with three irrigating solutions: a scanning electron microscopy evaluation. *J Endod.* 2009;35(6):900-3.
9. Mjor IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009;20(1):3-16.
10. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl.* 1984;3:13-29.
11. Dippel HW, Borggreven JM, Hoppenbrouwers PM. Morphology and permeability of the dentinal smear layer. *J Prosthet Dent.* 1984;52(5):657-62.
12. Mello I. Metodologia de avaliação da permeabilidade dentinária utilizando corante e da remoção do magma dentinário por meio de MEV no mesmo espécime radicular [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
13. Gambarini G. Shaping and cleaning the root canal system: A scanning electron microscopic evaluation of a new instrumentation and irrigation technique. *J Endod.* 1999;25(12):800-3.
14. Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. *J Endod.* 2002;28(6):433-7.
15. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(2):100-3.
16. Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad AF. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod.* 2009;35(1):78-81.
17. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(4):462-78.
18. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-93.
19. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001;27(7):452-5.
20. Costa EM, Evangelista AP, Medeiros AC, Dametto FR, Carvalho RA. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. *Braz Oral Res.* 2012;26(3):215-21.
21. Abdollahzadeh S, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. *J Dent (Tehran).* 2011;8(1):1-6.

22. Miguel MG, Neves MA, Antunes MD. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(25):2836-47.
23. Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*. 2009;14(5):1808-17.
24. Anesini C, Perez C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 1993;39(2):119-28.
25. Raskin I, Ripoll C. Can an apple a day keep the doctor away? *Current pharmaceutical design*. 2004;10(27):3419-29.
26. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol*. 2012;143(2):397-405.
27. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol*. 2007;109(2):177-206.
28. Silva JAT, Rana TS, Narzary D, Verma N, Meshram DT, Ranade SA. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*. 2013;160:85-107.
29. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*. 2009;134(3):244-8.
30. Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2007;29(2):79-92.
31. Vahid Dastjerdi E, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A. Effect of *Punica granatum* L. Flower Water Extract on Five Common Oral Bacteria and Bacterial Biofilm Formation on Orthodontic Wire. *Iranian journal of public health*. 2014;43(12):1688-94.
32. Dey D, Debnath S, Hazra S, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and metallo-beta-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012;50(12):4302-9.
33. Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC complementary and alternative medicine*. 2006;6:35.
34. Sharma A, Chandraker S, Patel VK, Ramteke P. Antibacterial Activity of Medicinal Plants Against Pathogens causing Complicated Urinary Tract Infections. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2009;71(2):136-9.
35. Batista AL, Lins RD, de Souza Coelho R, do Nascimento Barbosa D, Moura Belem N, Alves Celestino FJ. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. *Complementary therapies in clinical practice*. 2014;20(1):93-8.
36. Ghalayani P, Zolfaghary B, Farhad AR, Tavangar A, Soleymani B. The efficacy of *Punica granatum* extract in the management of recurrent aphthous stomatitis. *Journal of research in pharmacy practice*. 2013;2(2):88-92.
37. Vasconcelos LC, Sampaio MC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*. 2003;46(5-6):192-6.
38. Al-Shafi SM. Toxic effect of tannic and related compounds on human plasma proteins. *Saudi medical journal*. 2002;23(2):221-5.

39. Altunkaya A, Hedegaard RV, Harholt J, Brimer L, Gokmen V, Skibsted LH. Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. *Food & function*. 2013;4(10):1468-73.
40. Cerda B, Ceron JJ, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(11):3493-501.
41. Les F, Prieto JM, Arbones-Mainar JM, Valero MS, Lopez V. Bioactive properties of commercialised pomegranate (*Punica granatum*) juice: antioxidant, antiproliferative and enzyme inhibiting activities. *Food & function*. 2015;6(6):2049-57.
42. Brasil. Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. Brasília: Anvisa; 1959. 1264 p.
43. Brasil. Formulário de Fitoterápicos - Farmacopeia Brasileira. 1 ed. Brasília: Anvisa; 2011.
44. Capistrano SHB, Loiola MIB. Ceará flora, Brazil: Krameriaceae. *Rodriguésia*. 2015;66(3):905-12.
45. Simpson BB. The past and present uses of rhatany (*Krameria*, Krameriaceae). *Economic Botany*. 1991;45(3):397-409.
46. Herrera DR, Tay LY, Rezende EC, Kozlowski VA, Jr., Santos EB. In vitro antimicrobial activity of phytotherapeutic *Uncaria tomentosa* against endodontic pathogens. *Journal of oral science*. 2010;52(3):473-6.
47. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests fo bacteria that grow aerobically; Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007;M7-A7 23(2):9-18.
48. Salazar-Aranda R, Perez-Lopez LA, Lopez-Arroyo J, Alanis-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:536139.
49. Atila-Pektas B, Yurdakul P, Gulmez D, Gorduysus O. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *International endodontic journal*. 2013;46(5):413-8.
50. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009;37(1):76-81.
51. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982;45(5):31-4.
52. Geethaa S, Thavamany PJ, Chiew SP, Thong OM. Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2013;4(4):179-82.
53. WHO. The World Health Organization Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines do Classification 2004. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2004.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO BANCO DE DENTES HUMANOS DA UEPG



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
CURSO DE ODONTOLOGIA
Banco de Dentes Humanos

DECLARAÇÃO À COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos dessa instituição, o Banco de Dentes Humanos da UEPG apresenta dentes disponíveis necessários para a elaboração desta pesquisa.

Sendo assim, após aprovação da COEP/UEPG, nossa contribuição consistirá no oferecimento de **52 (cincoenta e dois) pré-molares inferiores com ápices completos** para execução do trabalho de pesquisa intitulado: **Efeito antimicrobiano de substâncias auxiliares experimentais baseadas em *Punica granatum* (romã) contra *Enterococcus faecalis***, a ser realizado por **Fabiane Schreiner** orientada pela **Profa. Dra. Nara Helen Campanha Bombarda** e co-orientada pela **Profa. Dra. Elizabete Brasil dos Santos**.

Ponta Grossa, 13 de abril de 2015.

Coordenadora do Banco de Dentes Humanos - UEPG

Universidade Estadual de Ponta Grossa
Banco de Dentes Humanos
Prof^a Dr^a Vania A. O. Queiroz
Coordenadora

ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE REGIONAL
INTEGRADA DO ALTO DO
URUGUAI E DAS MISSÕES -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito antimicrobiano de substâncias auxiliares experimentais baseadas em *Punica granatum* (romã) contra *Enterococcus faecalis*

Pesquisador: Nara Hellen Campanha Bombarda

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32649114.6.3001.5351

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.071.337

Data da Relatoria: 22/05/2015

Apresentação do Projeto:

Restabelecer a saúde, devolvendo aos dentes as suas funções constitui o foco do tratamento endodôntico, o qual consiste na limpeza, modelagem e desinfecção do sistema de canais radiculares através do preparo químico-mecânico. A falha do tratamento endodôntico relaciona-se comumente à presença do micro-organismo anaeróbio facultativo *Enterococcus faecalis*, que possui grande capacidade de virulência, de penetração nos túbulos dentinários e de aquisição de resistência a antibióticos. Assim, os pesquisadores pretendem analisar, *in vitro* e *ex vivo*, a ação antibacteriana de substâncias auxiliares e medicações intracanal produzidas a base de *Punica granatum* (romã) em gel, contra *E. faecalis*.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar, *in vitro* e *ex vivo*, a ação antibacteriana de substâncias auxiliares e medicações intracanal produzidas a base de *Punica granatum* (romã) em gel, contra *Enterococcus faecalis*.

Objetivo Secundário:

1. Desenvolver o extrato de romã. 2. Obter um gel à base de romã. 3. Incorporar o extrato de romã ao gel de clorexidina. 4. Avaliar a ação antimicrobiana do extrato de romã. 5. Determinar a toxicidade do extrato de romã sobre *Artemia salina*. 6. Verificar a capacidade de difusão do gel

Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621, prédio 12, sala 12.31.1

Bairro: Centro

CEP: 99.700-000

UF: RS

Município: ERECHIM

Telefone: (54)3520-9000

Fax: (54)3520-9090

E-mail: eticacomite@uri.com.br

UNIVERSIDADE REGIONAL
INTEGRADA DO ALTO DO
URUGUAI E DAS MISSÕES -



Continuação do Parecer: 1.071.337

contendo romã através dos canalículos dentinários. 7. Testar a ação antimicrobiana da romã como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. 8. Investigar a ação antimicrobiana da romã como medicação intracanal em canais radiculares contaminados com o micro-organismo testado. 9. Identificar o possível sinergismo antimicrobiano da associação de romã com clorexidina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Todas as normas de biosegurança aplicadas à clínica odontológica e laboratórios serão aplicadas, evitando ou minimizando qualquer risco eventual. A pesquisa será suspensa na eventualidade de qualquer risco não esperado.

Benefícios:

Espera-se que as substâncias auxiliares e as medicações intracanal experimentais sejam eficazes em seu efeito antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis*, sendo assim desenvolvida uma terapêutica promissora para o tratamento de infecções endodônticas persistentes em humanos, após testes clínicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante pois pretende verificar a atividade antibacteriana de *Punica granatum* (romã) em gel, contra *E. faecalis*, buscando desenvolver, após testes clínicos, novos produtos para tratamento de infecções endodônticas em humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória estão adequados ao estudo proposto.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto está apto a ser executado. Ao término do projeto o relatório deve ser inserido na Plataforma Brasil.

Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621, prédio 12, sala 12.31.1
Bairro: Centro **CEP:** 99.700-000
UF: RS **Município:** ERECHIM
Telefone: (54)3520-9000 **Fax:** (54)3520-9090 **E-mail:** eticacomite@uri.com.br

APÊNDICE A - DADOS PRIMÁRIOS EM MILÍMETROS DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR (MEDIÇÕES DE HALOS DE INIBIÇÃO)

Extrato	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
100%	14,15	16,89	17,24	19,10	19,71
(1 g/mL)	15,63	16,20	18,30	19,30	20,82
	14,43	15,25	18,68	18,73	19,07
50%	14,37	15,56	17,24	17,05	19,52
(0,5 g/mL)	13,47	15,13	17,82	18,25	18,64
	12,93	15,81	16,75	18,43	19,04
25%	12,40	14,09	13,39	17,74	18,44
(0,25 g/mL)	13,27	14,57	14,74	17,83	17,81
	12,92	15,88	13,37	17,52	17,22
12,5%	12,11	11,90	12,61	15,76	14,46
(0,12 g/mL)	11,19	12,50	13,02	14,86	14,86
	11,44	11,29	13,32	13,57	13,64
6,2%	9,40	0	0	12,24	11,54
(0,06 g/mL)	10,34			11,39	11,73
	9,74			10,15	10,81

Substância	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Clorexidina	10,15	11,33	13,08	17,23	13,37
0,12%	10,33	14,19	12,24	16,34	14,42
	9,27	12,34	12,19	15,05	11,15
Clorexidina	17,12	20,07	19,47	21,15	21,03
2%	17,23	20,32	20,14	21,28	22,17
	17,58	21,19	19,32	21,13	21,22
Soro	0	0	0	0	0

APÊNDICE B - DADOS PRIMÁRIOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE *Enterococcus faecalis*

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Resultados da verificação do crescimento de *E. faecalis* antes do plaqueamento para CBM

Linhas Placa 96 poços	romã1	romã2	romã3	I1	I2	I3	II1	II2	II3	0,12%	2%	Neg
A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
B	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
F	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
G	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

-: ausência de turvação

+: crescimento visível

Resultados da verificação do crescimento de *E. faecalis* após plaqueamento para CBM.

Linhas Placa 96 poços	romã1	romã2	romã3	I1	I2	I3	II1	II2	II3	0,12%	2%	Neg
A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

-: ausência de turvação

+: crescimento visível

CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Resultados da verificação do crescimento de *E. faecalis* após teste CBM.

Linhas Placa 96 poços	romã1	romã2	romã3	I1	I2	I3	II1	II2	II3	CLX 0,12%	CLX 2%
A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
C	+	+	+							-	-

-: ausência de turvação

+: crescimento visível

APÊNDICE C - DADOS PRIMÁRIOS EM mm DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR (MEDIÇÃO DOS HALOS DE INIBIÇÃO) E DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Repetição	Clorexidina			Romã			Carbopol		Hidroxiethylcelulose	
1	21,8	21,9	20,7	8,3	8,1	7,0	0	0	0	0
2	24,3	20,2	20,5	8,9	7,8	8,2	0	0	0	0
3	22,5	21,1	20,8	8,1	8,7	6,8	0	0	0	0

AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

Contagem de unidades formadoras de colônia antes da instrumentação - (diluição 1/100)

Dente	Carbopol		Romã		Clorexidina	
	Repetição		Repetição		Repetição	
	A	B	A	B	A	B
1	432	272	276	272	124	124
2	196	196	484	484	236	236
3	156	648	540	152	348	516
4	412	276	464	100	588	300
5	420	360	960	924	856	424
6	224	224	316	704	796	796
7	105	105	168	604	112	112
8	123	123	300	424	216	216
9	108	108	117	270	648	872
10	52	34	172	352	256	364

Contagem de unidades formadoras de colônia após a instrumentação - (diluição 1/100)

Dente	Carbopol		Romã		Clorexidina	
	Repetição		Repetição		Repetição	
	A	B	A	B	A	B
1	21	4	0	0	1	20
2	25	37	0	0	7	5
3	7	6	25	27	1	0
4	24	12	3	92	1	0
5	71	6	1	0	45	0
6	3	1	1	0	1	34
7	0	1	62	62	0	0
8	1	1	0	0	0	1
9	14	0	0	1	6	0
10	0	0	27	27	17	0

Contagem de unidades formadoras de colônia após 7 dias de medicação - (diluição 1/100)

Dente	Carbopol		Romã		Clorexidina	
	Repetição		Repetição		Repetição	
	A	B	A	B	A	B
1	244	244	0	0	0	0
2	512	120	0	1	0	0
3	57	36	0	0	0	0
4	56	520	0	1	0	0
5	348	312	284	148	0	0
6	106	106	0	0	5	4
7	1	10	2	7	0	0
8	25	49	640	640	0	0
9	102	3	580	580	0	5
10	1000	1000	8	5	0	0

APÊNDICE D - DADOS PRIMÁRIOS DA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

Tubos a

	Dicromato de potássio	Extrato	Glicerina e etanol	Etanol	Água salgada	Clorexidina 2%
1	0	0	0	0	10	0
2	0	0	0	0		
3	0	0	0	0		
4	0	0	0	0		
5	0	0	4	4		
6	0	0	6	5		
7	0	8	9	9		

Tubos b

	Dicromato de potássio	Extrato	Glicerina e etanol	Etanol	Água salgada	Clorexidina 2%
1	0	0	0	0	9	0
2	0	0	0	0		
3	0	0	0	0		
4	0	0	0	0		
5	0	0	6	5		
6	0	0	3	8		
7	0	8	10	9		

Tubos c

	Dicromato de potássio	Extrato	Glicerina e etanol	Etanol	Água salgada	Clorexidina 2%
1	0	0	0	0	10	0
2	0	0	0	0		
3	0	0	0	0		
4	0	0	0	0		
5	0	0	10	9		
6	0	8	10	10		
7	0	5	10	9		

APÊNDICE E - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

- 3 - Halos ext P aerug	
Tamanho da amostra =	15
Mínimo	9.400
Máximo	15.630
Amplitude Total	6.230
Mediana	12.920
Primeiro Quartil (25%)	11.3150
Terceiro Quartil (75%)	13.8100
Desvio Interquartilico	2.4950
Média Aritmética	12.519
Variância	3.323
Desvio Padrão	1.823
Erro Padrão	0.471
Coefficiente de Variação	14.56%
Assimetria (g1)	-0.227
Curtose (g2)	-0.701
Média Harmônica =	12.2585
N (média harmônica) =	15
Média Geométrica =	12.3909
N (média geométrica) =	15
Variância (geom.) =	1.0099
Desvio Padrão (geom.) =	1.1622

- 3 -	
Resultados	
Tamanho da amostra =	15
Média =	12.5193
Desvio padrão =	1.8230
W =	0.9706
p =	0.8299

Estatística Descritiva	
Arquivo Editar Gráfico	
- 4 - Halos ext Kleb	
Tamanho da amostra =	12
Mínimo	11.290
Máximo	16.890
Amplitude Total	5.600
Mediana	15.190
Primeiro Quartil (25%)	13.6925
Terceiro Quartil (75%)	15.8275
Desvio Interquartilico	2.1350
Média Aritmética	14.589
Variância	3.222
Desvio Padrão	1.795
Erro Padrão	0.518
Coefficiente de Variação	12.30%
Assimetria (g1)	-0.809
Curtose (g2)	-0.531
Média Harmônica =	14.3660
N (média harmônica) =	12
Média Geométrica =	14.4810
N (média geométrica) =	12
Variância (geom.) =	1.0073
Desvio Padrão (geom.) =	1.1385

Teste de Shapiro-Wilk	
Arquivo Editar Gráfico	
Resultados - 4 -	
Tamanho da amostra =	12
Média =	14.5892
Desvio padrão =	1.7951
W =	0.9027
p =	0.2314

Estatística Descritiva	
Arquivo Editar Gráfico	
- 5 - Halos ext E coli	
Tamanho da amostra =	12
Mínimo	12.610
Máximo	18.680
Amplitude Total	6.070
Mediana	15.745
Primeiro Quartil (25%)	13.3575
Terceiro Quartil (75%)	17.3850
Desvio Interquartilico	4.0275
Média Aritmética	15.540
Variância	5.432
Desvio Padrão	2.331
Erro Padrão	0.673
Coefficiente de Variação	15.00%
Assimetria (g1)	0.023
Curtose (g2)	-1.986
Média Harmônica =	15.2186
N (média harmônica) =	12
Média Geométrica =	15.3788
N (média geométrica) =	12
Variância (geom.) =	1.0100
Desvio Padrão (geom.) =	1.1632

Teste de Shapiro-Wilk	
Arquivo Editar Gráfico	
Resultados - 5 -	
Tamanho da amostra =	12
Média =	15.5400
Desvio padrão =	2.3307
W =	0.8591
p =	0.0501

Estadística Descritiva

Arquivo Editar Gráfico

- 6 -
Halos ext S aureus

Tamanho da amostra =	15
Mínimo	10.150
Máximo	19.300
Amplitude Total	9.150
Mediana	17.520
Primeiro Quartil (25%)	14.2150
Terceiro Quartil (75%)	18.3400
Desvio Interquartilico	4.1250
Média Aritmética	16.128
Variância	8.953
Desvio Padrão	2.992
Erro Padrão	0.773
Coefficiente de Variação	18.55%
Assimetria (g1)	-0.884
Curtose (g2)	-0.550
Média Harmônica =	15.5078
N (média harmônica) =	15
Média Geométrica =	15.8348
N (média geométrica) =	15
Variância (geom.) =	1.0184
Desvio Padrão (geom.) =	1.2276

Teste de Shapiro-Wilk

Arquivo Editar Gráfico

Resultados - 7 -

Tamanho da amostra =	15
Média =	268.4683
Desvio padrão =	89.9065
W =	0.8947
p =	0.0842

Estadística Descritiva

Arquivo Editar Gráfico

- 8 -
Halos ext E faecalis

Tamanho da amostra =	15
Mínimo	10.8100
Máximo	20.8200
Amplitude Total	10.0100
Mediana	17.8100
Primeiro Quartil (25%)	14.0500
Terceiro Quartil (75%)	19.0550
Desvio Interquartilico	5.0050
Média Aritmética	16.4873
Variância	11.1771
Desvio Padrão	3.3432
Erro Padrão	0.8632
Coefficiente de Variação	20.28%
Assimetria (g1)	-0.5532
Curtose (g2)	-1.2087
Média Harmônica =	15.7690
N (média harmônica) =	15
Média Geométrica =	16.1409
N (média geométrica) =	15
Variância (geom.) =	1.0210
Desvio Padrão (geom.) =	1.2447

Teste de Shapiro-Wilk

Arquivo Editar Gráfico

Resultados - 8 -

Tamanho da amostra =	15
Média =	16.4873
Desvio padrão =	3.3432
W =	0.8935
p =	0.0814

APÊNDICE F - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE *Enterococcus faecalis* POR ANÁLISE VISUAL DE CRESCIMENTO

Estatística Descritiva	
Arquivo Editar Gráfico	
- 2 - MIC visual	
Tamanho da amostra =	36
Mínimo	0.00
Máximo	1.00
Amplitude Total	1.00
Mediana	1.00
Primeiro Quartil (25%)	0.0000
Terceiro Quartil (75%)	1.0000
Desvio Interquartilico	1.0000
Média Aritmética	0.67
Variância	0.23
Desvio Padrão	0.48
Erro Padrão	0.08
Coefficiente de Variação	71.71%
Assimetria (g1)	-0.74
Curtose (g2)	-1.54
Média Harmônica =	1.0000
N (média harmônica) =	24
Média Geométrica =	1.0000
N (média geométrica) =	24
Variância (geom.) =	1.0000
Desvio Padrão (geom.) =	1.0000

D'Agostino	
Arquivo Editar Gráfico	
Resultados	Coluna 2
Tamanho da amostra =	36
D (Desvio) =	0.2357
Valores críticos 5%	0.2679 a 0.2867
Valores críticos 1%	0.2617 a 0.2873
p =	p < 0.01

APÊNDICE G - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO GEL COM EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *P. granatum* (0,5 g/mL), POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR SOBRE *E. faecalis*

Estadística Descritiva	
- 9 - Halos GEL E faecalis	
Tamanho da amostra =	9
Mínimo	6.800
Máximo	8.700
Amplitude Total	1.900
Mediana	8.000
Primeiro Quartil (25%)	7.8000
Terceiro Quartil (75%)	8.1000
Desvio Interquartilico	0.3000
Média Aritmética	7.844
Variância	0.350
Desvio Padrão	0.592
Erro Padrão	0.197
Coefficiente de Variação	7.54%
Assimetria (g1)	-0.808
Curtose (g2)	0.354
Média Harmônica =	7.8025
N (média harmônica) =	9
Média Geométrica =	7.8239
N (média geométrica) =	9
Variância (geom.) =	1.0026
Desvio Padrão (geom.) =	1.0807

Teste de Shapiro-Wilk	
Resultados	
Tamanho da amostra =	9
Média =	7.8444
Desvio padrão =	0.5918
W =	0.8766
p =	0.1925

APÊNDICE H - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÊIS EM DENTINA INFECTADA NOS TRÊS TEMPOS EXPERIMENTAIS (INICIAL, PÓS INSTRUMENTAÇÃO E APÓS USO COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL)

	- 1 - Inicial CAR	- 4 - Inical R	- 7 - Inicial CLX
Tamanho da amostra =	10	10	10
Mínimo	43.00	193.000	112.000
Máximo	402.00	942.000	796.000
Amplitude Total	359.00	749.000	684.000
Mediana	210.00	354.000	371.000
Primeiro Quartil (25%)	111.7500	276.0000	221.0000
Terceiro Quartil (75%)	350.0000	459.5000	591.0000
Desvio Interquartilico	238.2500	183.5000	370.0000
Média Aritmética	228.70	404.100	407.000
Variância	17907.34	45444.544	63828.667
Desvio Padrão	133.82	213.177	252.643
Erro Padrão	42.32	67.413	79.893
Coefficiente de Variação	58.51%	52.75%	62.07%
Assimetria (g1)	0.09	2.018	0.468
Curtose (g2)	-1.79	4.834	-1.252
Média Harmônica =	141.7739	338.6889	264.6381
N (média harmônica) =	10	10	10
Média Geométrica =	186.1608	366.6652	332.0581
N (média geométrica) =	10	10	10
Variância (geom.) =	1.2669	1.0887	1.2420
Desvio Padrão (geom.) =	2.0919	1.5564	2.0268

Resultados	Coluna 1	Coluna 4	Coluna 7
Tamanho da amostra =	10	10	10
D (Desvio) =	0.2811	0.2436	0.2811
Valores críticos 5%	0.2513 a 0.2849	0.2513 a 0.2849	0.2513 a 0.2849
Valores críticos 1%	0.2379 a 0.2857	0.2379 a 0.2857	0.2379 a 0.2857
p =	ns	p < 0.05	ns

	- 1 - Inicial CAR	- 4 - Inical R	- 7 - Inicial CLX
Tamanho da amostra =	10	10	10
Desvio máximo =	0.2056	0.2338	0.1507
Valor crítico (0.05) =	0.2580	0.2580	0.2580
Valor crítico (0.01) =	0.2940	0.2940	0.2940
p(valor)	ns	ns	ns

	- 2 - Inst CAR	- 5 - Inst R	- 8 - Inst CLX
Tamanho da amostra =	10	10	10
Mínimo	0.00	0.000	0.0000
Máximo	38.00	62.000	22.0000
Amplitude Total	38.00	62.000	22.0000
Mediana	6.50	0.000	4.5000
Primeiro Quartil (25%)	1.2500	0.0000	0.0000
Terceiro Quartil (75%)	16.5000	26.7500	9.5000
Desvio Interquartilico	15.2500	26.7500	9.5000
Média Aritmética	11.50	16.200	6.6000
Variância	182.28	537.067	60.7111
Desvio Padrão	13.50	23.175	7.7917
Erro Padrão	4.27	7.328	2.4640
Coefficiente de Variação	117.40%	143.05%	118.06%
Assimetria (g1)	1.18	1.138	1.0635
Curtose (g2)	0.23	0.001	0.1515
Média Harmônica =	3.9861	35.4283	7.2352
N (média harmônica) =	8	4	6
Média Geométrica =	8.2458	37.8187	9.0200
N (média geométrica) =	8	4	6
Variância (geom.) =	2.0315	1.0822	1.2533
Desvio Padrão (geom.) =	3.5876	1.5318	2.0566

Resultados	Coluna 2	Coluna 5	Coluna 8
Tamanho da amostra =	10	10	10
D (Desvio) =	0.2635	0.2502	0.2665
Valores críticos 5%	0.2513 a 0.2849	0.2513 a 0.2849	0.2513 a 0.2849
Valores críticos 1%	0.2379 a 0.2857	0.2379 a 0.2857	0.2379 a 0.2857
p =	ns	p < 0.05	ns

	- 2 - Inst CAR	- 5 - Inst R	- 8 - Inst CLX
Tamanho da amostra =	10	10	10
Desvio máximo =	0.2305	0.3577	0.2015
Valor crítico (0.05) =	0.2580	0.2580	0.2580
Valor crítico (0.01) =	0.2940	0.2940	0.2940
p(valor)	ns	< 0.01	ns

	- 3 - Med CAR	- 6 - Med R	- 9 - Med CLX
Tamanho da amostra =	10	10	10
Mínimo	5.000	0.000	0.000
Máximo	1000.000	640.000	4.000
Amplitude Total	995.000	640.000	4.000
Mediana	175.000	2.000	0.000
Primeiro Quartil (25%)	47.5000	0.0000	0.0000
Terceiro Quartil (75%)	309.0000	163.5000	0.0000
Desvio Interquartilico	261.5000	163.5000	0.0000
Média Aritmética	242.400	144.600	0.600
Variância	86789.822	64846.267	1.822
Desvio Padrão	294.601	254.649	1.350
Erro Padrão	93.161	80.527	0.427
Coefficiente de Variação	121.54%	176.11%	224.98%
Assimetria (g1)	2.156	1.547	2.277
Curtose (g2)	5.443	0.806	4.765
Média Harmônica =	34.2236	11.7763	2.6667
N (média harmônica) =	10	5	2
Média Geométrica =	113.1416	71.9208	2.8284
N (média geométrica) =	10	5	2
Variância (geom.) =	2.7297	14.8705	1.1100
Desvio Padrão (geom.) =	4.5750	12.0987	1.6325

Resultados	Coluna 3	Coluna 6	Coluna 9
Tamanho da amostra =	10	10	10
D (Desvio) =	0.2362	0.2261	0.1952
Valores críticos 5%	0.2513 a 0.2849	0.2513 a 0.2849	0.2513 a 0.2849
Valores críticos 1%	0.2379 a 0.2857	0.2379 a 0.2857	0.2379 a 0.2857
p =	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.01

	- 3 - Med CAR	- 6 - Med R	- 9 - Med CLX
Tamanho da amostra =	10	10	10
Desvio máximo =	0.2831	0.4069	0.4717
Valor crítico (0.05) =	0.2580	0.2580	0.2580
Valor crítico (0.01) =	0.2940	0.2940	0.2940
p(valor)	< 0.05	< 0.01	< 0.01

APÊNDICE I - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTES DE NORMALIDADE DA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

Estatística Descritiva	
Arquivo Editar Gráfico	
- 1 - A salina	
Tamanho da amostra =	33
Mínimo	0.00
Máximo	10.00
Amplitude Total	10.00
Mediana	8.00
Primeiro Quartil (25%)	3.0000
Terceiro Quartil (75%)	9.0000
Desvio Interquartilico	6.0000
Média Aritmética	5.88
Variância	15.30
Desvio Padrão	3.91
Erro Padrão	0.68
Coefficiente de Variação	66.53%
Assimetria (g1)	-0.53
Curtose (g2)	-1.32
Média Harmônica =	6.8807
N (média harmônica) =	25
Média Geométrica =	7.3602
N (média geométrica) =	25
Variância (geom.) =	1.0560
Desvio Padrão (geom.) =	1.4249

D'Agostino	
Arquivo Editar Gráfico	
Resultados	Coluna 1
Tamanho da amostra =	33
D (Desvio) =	0.2754
Valores críticos 5%	0.2671 a 0.2867
Valores críticos 1%	0.2605 a 0.2873
p =	ns

Normalidade Teste de Lill...	
Arquivo Editar Gráfico	
- 1 - A salina	
Tamanho da amostra =	33
Desvio máximo =	0.2214
Valor crítico (0.05) =	0.1542
Valor crítico (0.01) =	0.1795
p(valor)	< 0.01

APÊNDICE J - ANOVA COM PÓS-TESTE SCHEFFÉ PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO E AS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROGLICÓLICO DO PERICARPO DE *Punica granatum* L. SOBRE CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* PELO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ext_P_aerug	2,128	7	16	,100
Ext_Kleb	3,027	7	16	,032
Ext_E_coli	3,588	7	16	,016
Ext_S_aur	2,784	7	16	,043
Ext_E_faec	2,729	7	16	,046

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ext_P_aerug	Between Groups	562,290	7	80,327	295,969	,000
	Within Groups	4,342	16	,271		
	Total	566,633	23			
Ext_Kleb	Between Groups	1187,534	7	169,648	303,611	,000
	Within Groups	8,940	16	,559		
	Total	1196,474	23			
Ext_E_coli	Between Groups	1245,905	7	177,986	702,059	,000
	Within Groups	4,056	16	,254		
	Total	1249,962	23			
Ext_S_aur	Between Groups	931,190	7	133,027	253,606	,000
	Within Groups	8,393	16	,525		
	Total	939,582	23			
Ext_E_faec	Between Groups	995,043	7	142,149	221,527	,000
	Within Groups	10,267	16	,642		
	Total	1005,309	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Scheffe						
Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
Ext_P_aerug	1 g/mL	0,5 g/mL	1,14667	,42537	,444	
		0,25 g/mL	1,87333*	,42537	,043	
		0,12 g/mL	3,15667*	,42537	,000	
		0,06 g/mL	4,91000*	,42537	,000	
		CLX 0,12%	4,82000*	,42537	,000	
		CLX 2%	-2,57333*	,42537	,003	
		SORO	14,73667*	,42537	,000	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe				95% Confidence Interval	
Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Lower Bound	Upper Bound	
Ext_P_aerug	1 g/mL	0,5 g/mL	-,6879	2,9812	
		0,25 g/mL	,0388	3,7079	
		0,12 g/mL	1,3221	4,9912	
		0,06 g/mL	3,0755	6,7445	
		CLX 0,12%	2,9855	6,6545	
		CLX 2%	-4,4079	-,7388	
		SORO	12,9021	16,5712	

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_P_aerug	0,5 g/mL	1 g/mL	-1,14667	,42537	,444
		0,25 g/mL	,72667	,42537	,878
		0,12 g/mL	2,01000*	,42537	,026
		0,06 g/mL	3,76333*	,42537	,000
		CLX 0,12%	3,67333*	,42537	,000
		CLX 2%	-3,72000*	,42537	,000
		SORO	13,59000*	,42537	,000
	0,25 g/mL	1 g/mL	-1,87333*	,42537	,043
		0,5 g/mL	-,72667	,42537	,878
		0,12 g/mL	1,28333	,42537	,312
		0,06 g/mL	3,03667*	,42537	,001
		CLX 0,12%	2,94667*	,42537	,001
		CLX 2%	-4,44667*	,42537	,000
		SORO	12,86333*	,42537	,000
	0,12 g/mL	1 g/mL	-3,15667*	,42537	,000
		0,5 g/mL	-2,01000*	,42537	,026
		0,25 g/mL	-1,28333	,42537	,312
		0,06 g/mL	1,75333	,42537	,067
		CLX 0,12%	1,66333	,42537	,093
		CLX 2%	-5,73000*	,42537	,000
		SORO	11,58000*	,42537	,000
	0,06 g/mL	1 g/mL	-4,91000*	,42537	,000
		0,5 g/mL	-3,76333*	,42537	,000
		0,25 g/mL	-3,03667*	,42537	,001
		0,12 g/mL	-1,75333	,42537	,067
		CLX 0,12%	-,09000	,42537	1,000
		CLX 2%	-7,48333*	,42537	,000
		SORO	9,82667*	,42537	,000
CLX 0,12%	1 g/mL	-4,82000*	,42537	,000	
	0,5 g/mL	-3,67333*	,42537	,000	
	0,25 g/mL	-2,94667*	,42537	,001	
	0,12 g/mL	-1,66333	,42537	,093	
	0,06 g/mL	,09000	,42537	1,000	
	CLX 2%	-7,39333*	,42537	,000	
	SORO	9,91667*	,42537	,000	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_P_aerug	CLX 2%	1 g/mL	2,57333*	,42537	,003
		0,5 g/mL	3,72000*	,42537	,000
		0,25 g/mL	4,44667*	,42537	,000
		0,12 g/mL	5,73000*	,42537	,000
		0,06 g/mL	7,48333*	,42537	,000
		CLX 0,12%	7,39333*	,42537	,000
		SORO	17,31000*	,42537	,000
	SORO	1 g/mL	-14,73667*	,42537	,000
		0,5 g/mL	-13,59000*	,42537	,000
		0,25 g/mL	-12,86333*	,42537	,000
		0,12 g/mL	-11,58000*	,42537	,000
		0,06 g/mL	-9,82667*	,42537	,000
		CLX 0,12%	-9,91667*	,42537	,000
		CLX 2%	-17,31000*	,42537	,000
Ext_Kleb	1 g/mL	0,5 g/mL	,61333	,61034	,993
		0,25 g/mL	1,26667	,61034	,736
		0,12 g/mL	4,21667*	,61034	,001
		0,06 g/mL	16,11333*	,61034	,000
		CLX 0,12%	3,49333*	,61034	,005
		CLX 2%	-4,41333*	,61034	,000
		SORO	16,11333*	,61034	,000
	0,5 g/mL	1 g/mL	-,61333	,61034	,993
		0,25 g/mL	,65333	,61034	,989
		0,12 g/mL	3,60333*	,61034	,004
		0,06 g/mL	15,50000*	,61034	,000
		CLX 0,12%	2,88000*	,61034	,026
		CLX 2%	-5,02667*	,61034	,000
		SORO	15,50000*	,61034	,000
	0,25 g/mL	1 g/mL	-1,26667	,61034	,736
		0,5 g/mL	-,65333	,61034	,989
		0,12 g/mL	2,95000*	,61034	,022
		0,06 g/mL	14,84667*	,61034	,000
		CLX 0,12%	2,22667	,61034	,136
		CLX 2%	-5,68000*	,61034	,000
		SORO	14,84667*	,61034	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_Kleb	0,12 g/mL	1 g/mL	-4,21667*	,61034	,001
		0,5 g/mL	-3,60333*	,61034	,004
		0,25 g/mL	-2,95000*	,61034	,022
		0,06 g/mL	11,89667*	,61034	,000
		CLX 0,12%	-,72333	,61034	,981
		CLX 2%	-8,63000*	,61034	,000
		SORO	11,89667*	,61034	,000
	0,06 g/mL	1 g/mL	-16,11333*	,61034	,000
		0,5 g/mL	-15,50000*	,61034	,000
		0,25 g/mL	-14,84667*	,61034	,000
		0,12 g/mL	-11,89667*	,61034	,000
		CLX 0,12%	-12,62000*	,61034	,000
		CLX 2%	-20,52667*	,61034	,000
		SORO	,00000	,61034	1,000
	CLX 0,12%	1 g/mL	-3,49333*	,61034	,005
		0,5 g/mL	-2,88000*	,61034	,026
		0,25 g/mL	-2,22667	,61034	,136
		0,12 g/mL	,72333	,61034	,981
		0,06 g/mL	12,62000*	,61034	,000
		CLX 2%	-7,90667*	,61034	,000
		SORO	12,62000*	,61034	,000
	CLX 2%	1 g/mL	4,41333*	,61034	,000
		0,5 g/mL	5,02667*	,61034	,000
		0,25 g/mL	5,68000*	,61034	,000
		0,12 g/mL	8,63000*	,61034	,000
		0,06 g/mL	20,52667*	,61034	,000
		CLX 0,12%	7,90667*	,61034	,000
		SORO	20,52667*	,61034	,000
SORO	1 g/mL	-16,11333*	,61034	,000	
	0,5 g/mL	-15,50000*	,61034	,000	
	0,25 g/mL	-14,84667*	,61034	,000	
	0,12 g/mL	-11,89667*	,61034	,000	
	0,06 g/mL	,00000	,61034	1,000	
	CLX 0,12%	-12,62000*	,61034	,000	
	CLX 2%	-20,52667*	,61034	,000	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_E_coli	1 g/mL	0,5 g/mL	,80333	,41111	,788
		0,25 g/mL	4,24000*	,41111	,000
		0,12 g/mL	5,09000*	,41111	,000
		0,06 g/mL	18,07333*	,41111	,000
		CLX 0,12%	5,57000*	,41111	,000
		CLX 2%	-1,57000	,41111	,106
		SORO	18,07333*	,41111	,000
	0,5 g/mL	1 g/mL	-,80333	,41111	,788
		0,25 g/mL	3,43667*	,41111	,000
		0,12 g/mL	4,28667*	,41111	,000
		0,06 g/mL	17,27000*	,41111	,000
		CLX 0,12%	4,76667*	,41111	,000
		CLX 2%	-2,37333*	,41111	,005
		SORO	17,27000*	,41111	,000
	0,25 g/mL	1 g/mL	-4,24000*	,41111	,000
		0,5 g/mL	-3,43667*	,41111	,000
		0,12 g/mL	,85000	,41111	,739
		0,06 g/mL	13,83333*	,41111	,000
		CLX 0,12%	1,33000	,41111	,238
		CLX 2%	-5,81000*	,41111	,000
		SORO	13,83333*	,41111	,000
	0,12 g/mL	1 g/mL	-5,09000*	,41111	,000
		0,5 g/mL	-4,28667*	,41111	,000
		0,25 g/mL	-,85000	,41111	,739
		0,06 g/mL	12,98333*	,41111	,000
		CLX 0,12%	,48000	,41111	,982
		CLX 2%	-6,66000*	,41111	,000
		SORO	12,98333*	,41111	,000
0,06 g/mL	1 g/mL	-18,07333*	,41111	,000	
	0,5 g/mL	-17,27000*	,41111	,000	
	0,25 g/mL	-13,83333*	,41111	,000	
	0,12 g/mL	-12,98333*	,41111	,000	
	CLX 0,12%	-12,50333*	,41111	,000	
	CLX 2%	-19,64333*	,41111	,000	
	SORO	,00000	,41111	1,000	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_E_coli	CLX 0,12%	1 g/mL	-5,57000*	,41111	,000
		0,5 g/mL	-4,76667*	,41111	,000
		0,25 g/mL	-1,33000	,41111	,238
		0,12 g/mL	-,48000	,41111	,982
		0,06 g/mL	12,50333*	,41111	,000
		CLX 2%	-7,14000*	,41111	,000
		SORO	12,50333*	,41111	,000
	CLX 2%	1 g/mL	1,57000	,41111	,106
		0,5 g/mL	2,37333*	,41111	,005
		0,25 g/mL	5,81000*	,41111	,000
		0,12 g/mL	6,66000*	,41111	,000
		0,06 g/mL	19,64333*	,41111	,000
		CLX 0,12%	7,14000*	,41111	,000
		SORO	19,64333*	,41111	,000
	SORO	1 g/mL	-18,07333*	,41111	,000
		0,5 g/mL	-17,27000*	,41111	,000
		0,25 g/mL	-13,83333*	,41111	,000
		0,12 g/mL	-12,98333*	,41111	,000
		0,06 g/mL	,00000	,41111	1,000
		CLX 0,12%	-12,50333*	,41111	,000
		CLX 2%	-19,64333*	,41111	,000
Ext_S_aur	1 g/mL	0,5 g/mL	1,13333	,59135	,803
		0,25 g/mL	1,34667	,59135	,642
		0,12 g/mL	4,31333*	,59135	,000
		0,06 g/mL	7,78333*	,59135	,000
		CLX 0,12%	2,83667*	,59135	,023
		CLX 2%	-2,14333	,59135	,141
		SORO	19,04333*	,59135	,000
	0,5 g/mL	1 g/mL	-1,13333	,59135	,803
		0,25 g/mL	,21333	,59135	1,000
		0,12 g/mL	3,18000*	,59135	,009
		0,06 g/mL	6,65000*	,59135	,000
		CLX 0,12%	1,70333	,59135	,364
		CLX 2%	-3,27667*	,59135	,007
		SORO	17,91000*	,59135	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_S_aur	0,25 g/mL	1 g/mL	-1,34667	,59135	,642
		0,5 g/mL	-,21333	,59135	1,000
		0,12 g/mL	2,96667*	,59135	,016
		0,06 g/mL	6,43667*	,59135	,000
		CLX 0,12%	1,49000	,59135	,525
		CLX 2%	-3,49000*	,59135	,004
		SORO	17,69667*	,59135	,000
	0,12 g/mL	1 g/mL	-4,31333*	,59135	,000
		0,5 g/mL	-3,18000*	,59135	,009
		0,25 g/mL	-2,96667*	,59135	,016
		0,06 g/mL	3,47000*	,59135	,004
		CLX 0,12%	-1,47667	,59135	,536
		CLX 2%	-6,45667*	,59135	,000
		SORO	14,73000*	,59135	,000
	0,06 g/mL	1 g/mL	-7,78333*	,59135	,000
		0,5 g/mL	-6,65000*	,59135	,000
		0,25 g/mL	-6,43667*	,59135	,000
		0,12 g/mL	-3,47000*	,59135	,004
		CLX 0,12%	-4,94667*	,59135	,000
		CLX 2%	-9,92667*	,59135	,000
		SORO	11,26000*	,59135	,000
	CLX 0,12%	1 g/mL	-2,83667*	,59135	,023
		0,5 g/mL	-1,70333	,59135	,364
		0,25 g/mL	-1,49000	,59135	,525
		0,12 g/mL	1,47667	,59135	,536
		0,06 g/mL	4,94667*	,59135	,000
		CLX 2%	-4,98000*	,59135	,000
		SORO	16,20667*	,59135	,000
CLX 2%	1 g/mL	2,14333	,59135	,141	
	0,5 g/mL	3,27667*	,59135	,007	
	0,25 g/mL	3,49000*	,59135	,004	
	0,12 g/mL	6,45667*	,59135	,000	
	0,06 g/mL	9,92667*	,59135	,000	
	CLX 0,12%	4,98000*	,59135	,000	
	SORO	21,18667*	,59135	,000	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_S_aur	SORO	1 g/mL	-19,04333*	,59135	,000
		0,5 g/mL	-17,91000*	,59135	,000
		0,25 g/mL	-17,69667*	,59135	,000
		0,12 g/mL	-14,73000*	,59135	,000
		0,06 g/mL	-11,26000*	,59135	,000
		CLX 0,12%	-16,20667*	,59135	,000
		CLX 2%	-21,18667*	,59135	,000
Ext_E_faec	1 g/mL	0,5 g/mL	,80000	,65405	,977
		0,25 g/mL	2,04333	,65405	,274
		0,12 g/mL	5,54667*	,65405	,000
		0,06 g/mL	8,50667*	,65405	,000
		CLX 0,12%	6,88667*	,65405	,000
		CLX 2%	-1,60667	,65405	,555
		SORO	19,86667*	,65405	,000
	0,5 g/mL	1 g/mL	-,80000	,65405	,977
		0,25 g/mL	1,24333	,65405	,809
		0,12 g/mL	4,74667*	,65405	,000
		0,06 g/mL	7,70667*	,65405	,000
		CLX 0,12%	6,08667*	,65405	,000
		CLX 2%	-2,40667	,65405	,130
		SORO	19,06667*	,65405	,000
	0,25 g/mL	1 g/mL	-2,04333	,65405	,274
		0,5 g/mL	-1,24333	,65405	,809
		0,12 g/mL	3,50333*	,65405	,009
		0,06 g/mL	6,46333*	,65405	,000
		CLX 0,12%	4,84333*	,65405	,000
		CLX 2%	-3,65000*	,65405	,006
		SORO	17,82333*	,65405	,000
0,12 g/mL	1 g/mL	-5,54667*	,65405	,000	
	0,5 g/mL	-4,74667*	,65405	,000	
	0,25 g/mL	-3,50333*	,65405	,009	
	0,06 g/mL	2,96000*	,65405	,036	
	CLX 0,12%	1,34000	,65405	,748	
	CLX 2%	-7,15333*	,65405	,000	
	SORO	14,32000*	,65405	,000	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Concentrações	(J) Concentrações	Mean	Std. Error	Sig.
			Difference (I-J)		
Ext_E_faec	0,06 g/mL	1 g/mL	-8,50667*	,65405	,000
		0,5 g/mL	-7,70667*	,65405	,000
		0,25 g/mL	-6,46333*	,65405	,000
		0,12 g/mL	-2,96000*	,65405	,036
		CLX 0,12%	-1,62000	,65405	,546
		CLX 2%	-10,11333*	,65405	,000
		SORO	11,36000*	,65405	,000
	CLX 0,12%	1 g/mL	-6,88667*	,65405	,000
		0,5 g/mL	-6,08667*	,65405	,000
		0,25 g/mL	-4,84333*	,65405	,000
		0,12 g/mL	-1,34000	,65405	,748
		0,06 g/mL	1,62000	,65405	,546
		CLX 2%	-8,49333*	,65405	,000
		SORO	12,98000*	,65405	,000
	CLX 2%	1 g/mL	1,60667	,65405	,555
		0,5 g/mL	2,40667	,65405	,130
		0,25 g/mL	3,65000*	,65405	,006
		0,12 g/mL	7,15333*	,65405	,000
		0,06 g/mL	10,11333*	,65405	,000
		CLX 0,12%	8,49333*	,65405	,000
		SORO	21,47333*	,65405	,000
	SORO	1 g/mL	-19,86667*	,65405	,000
		0,5 g/mL	-19,06667*	,65405	,000
		0,25 g/mL	-17,82333*	,65405	,000
		0,12 g/mL	-14,32000*	,65405	,000
		0,06 g/mL	-11,36000*	,65405	,000
		CLX 0,12%	-12,98000*	,65405	,000
		CLX 2%	-21,47333*	,65405	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE K - ANOVA COM PÓS-TESTE SCHEFFÉ PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS POR MEIO DE DO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

```

GET
  FILE='C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados gel C
  OMPARA SUBSTÂNCIAS.sav'.
ONEWAY Gel_E_faec BY Substâncias
  /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
  /PLOT MEANS
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC=SCHEFFE ALPHA(0.05) .

```

Oneway

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados ge
l COMPARA SUBSTÂNCIAS.sav

Descriptives

Gel E faec					95% Confidence Interval for Mean	
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Gel 0,5 g/mL	9	7,9889	,70079	,23360	7,4502	8,5276
CLX 2%	9	21,5333	1,27769	,42590	20,5512	22,5155
Veículos	9	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000
Total	27	9,8407	9,09325	1,75000	6,2436	13,4379

Descriptives

Gel E faec		
	Minimum	Maximum
Gel 0,5 g/mL	6,80	8,90
CLX 2%	20,20	24,30
Veículos	,00	,00
Total	,00	24,30

Test of Homogeneity of Variances

Gel E faec			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8,459	2	24	,002

ANOVA

Gel E faec					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2132,876	2	1066,438	1506,544	,000

ANOVA

Gel E faec

	Sum of Squares	df	Mean Square
Within Groups	16,989	24	,708
Total	2149,865	26	

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Gel E faec
Scheffe

(I) Substâncias	(J) Substâncias	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Gel 0,5 g/mL	CLX 2%	-13,54444*	,39662	,000
	Veículos	7,98889*	,39662	,000
CLX 2%	Gel 0,5 g/mL	13,54444*	,39662	,000
	Veículos	21,53333*	,39662	,000
Veículos	Gel 0,5 g/mL	-7,98889*	,39662	,000
	CLX 2%	-21,53333*	,39662	,000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Gel E faec
Scheffe

(I) Substâncias	(J) Substâncias	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
Gel 0,5 g/mL	CLX 2%	-14,5791	-12,5098
	Veículos	6,9542	9,0236
CLX 2%	Gel 0,5 g/mL	12,5098	14,5791
	Veículos	20,4987	22,5680
Veículos	Gel 0,5 g/mL	-9,0236	-6,9542
	CLX 2%	-22,5680	-20,4987

Homogeneous Subsets

APÊNDICE L - TESTE FRIEDMAN PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRÊS TEMPOS EXPERIMENTAIS, COM PAREAMENTO DE DENTES, PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

```

NPAR TESTS
  /FRIEDMAN=Carbop_inicial Carbop_inst Carbop_med
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING LISTWISE.

```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Carbopol inicial	10	228,7000	133,81833	43,00	402,00
Carbopol instrumentação	10	11,7000	13,54458	,00	38,50
Carbopol medicação	10	242,5500	294,48349	5,50	1000,00

Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
Carbopol inicial	2,70
Carbopol instrumentação	1,00
Carbopol medicação	2,30

Test Statistics^a

N	10
Chi-Square	15,800
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

```

NPAR TESTS
  /FRIEDMAN=CLX_inicial CLX_inst CLX_med
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING LISTWISE.

```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
CLX inicial	10	407,0000	252,64336	112,00	796,00
CLX instrumentação	10	6,9500	7,87207	,00	22,50
CLX medicação	10	,7000	1,54919	,00	4,50

Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
CLX inicial	3,00
CLX instrumentação	1,95
CLX medicação	1,05

Test Statistics^a

N	10
Chi-Square	19,538
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

```

NPAR TESTS
  /FRIEDMAN=Romã_inicial Romã_inst Romã_med
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING LISTWISE.

```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Romã inicial	10	404,1500	213,12230	193,50	942,00
Romã instrumentação	10	16,4000	23,13343	,00	62,00
Romã medicação	10	144,8000	254,52540	,00	640,00

Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
Romã inicial	2,80
Romã instrumentação	1,30
Romã medicação	1,90

Test Statistics^a

N	10
Chi-Square	12,000
df	2
Asymp. Sig.	,002

a. Friedman Test

APÊNDICE M - TESTE KRUSKAL-WALLIS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS TRÊS SUBSTÂNCIAS PARA VERIFICAÇÃO AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

NPART TESTS

```
/K-W=Inicial Instrumentação Medicação BY Substâncias(1 3)
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS.
```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Inicial	30	346,6167	215,99967	43,00	942,00
Instrumentação	30	11,6833	16,05136	,00	62,00
Medicação	30	129,3500	239,22234	,00	1000,00
Substâncias	30	2,00	,830	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Substâncias	N	Mean Rank
Inicial	Carbopol	10	10,60
	Romã	10	18,30
	Clorexidina	10	17,60
	Total	30	
Instrumentação	Carbopol	10	17,30
	Romã	10	14,60
	Clorexidina	10	14,60
	Total	30	
Medicação	Carbopol	10	23,10
	Romã	10	15,65
	Clorexidina	10	7,75
	Total	30	

Test Statistics^{a,b}

	Inicial	Instrumentação	Medicação
Chi-Square	4,679	,638	15,996
df	2	2	2
Asymp. Sig.	,096	,727	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Substâncias

APÊNDICE N - TESTE WILCOXON PARA COMPARAÇÃO PAR-A-PAR ENTRE OS TEMPOS EXPERIMENTAIS, COM PAREAMENTO DE DENTES, PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

Test Statistics^c

	Carbopol instrumentação - Carbopol inicial	Carbopol medicação - Carbopol instrumentação	Carbopol medicação - Carbopol inicial	Romã instrumentação - Romã inicial	Romã medicação - Romã instrumentação
Z	-2,803 ^a	-2,803 ^b	-,866 ^a	-2,803 ^a	-1,612 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005	,005	,386	,005	,107

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Test Statistics^c

	Romã medicação - Romã inicial	CLX instrumentação - CLX inicial	CLX medicação - CLX instrumentação	CLX medicação - CLX inicial
Z	-1,988 ^a	-2,803 ^a	-2,689 ^a	-2,803 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,047	,005	,007	,005

a. Based on positive ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

APÊNDICE O - TESTE MANN-WHITNEY PARA COMPARAÇÃO PAR-A-PAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS PARA VERIFICAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS GÉIS EM DENTINA INFECTADA

NPAR TESTS

```
/M-W= Inicial_CAR_CLX Inst_CAR_CLX Med_CAR_CLX BY Substâncias_CAR_CLX(1 2)
/STATISTICS=DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS.
```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Inicial_CAR_CLX	20	317,8500	216,98636	43,00	796,00
Inst_CAR_CLX	20	9,3250	11,05402	,00	38,50
Med_CAR_CLX	20	121,6250	237,63788	,00	1000,00
Substâncias_CAR_CLX	20	1,50	,513	1	2

Mann-Whitney Test

Ranks

Substâncias_CAR_CLX		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Inicial_CAR_CLX	Carbopol	10	8,10	81,00
	Clorexidina	10	12,90	129,00
	Total	20		
Inst_CAR_CLX	Carbopol	10	11,50	115,00
	Clorexidina	10	9,50	95,00
	Total	20		
Med_CAR_CLX	Carbopol	10	15,50	155,00
	Clorexidina	10	5,50	55,00
	Total	20		

Test Statistics^b

	Inicial_CAR_CLX	Inst_CAR_CLX	Med_CAR_CLX
Mann-Whitney U	26,000	40,000	,000
Wilcoxon W	81,000	95,000	55,000
Z	-1,814	-,759	-3,905
Asymp. Sig. (2-tailed)	,070	,448	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,075 ^a	,481 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Substâncias_CAR_CLX

NPAR TESTS

```

/M-W= Inicial_CAR_R Inst_CAR_R Med_CAR_R BY Substâncias_CAR_R(1 2)
/STATISTICS=DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS.

```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Inicial_CAR_R	20	316,4250	195,18812	43,00	942,00
Inst_CAR_R	20	14,0500	18,60666	,00	62,00
Med_CAR_R	20	193,6750	272,54248	,00	1000,00
Substâncias_CAR_R	20	1,50	,513	1	2

Mann-Whitney Test**Ranks**

Substâncias_CAR_R		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Inicial_CAR_R	Carpobol	10	8,00	80,00
	Romã	10	13,00	130,00
	Total	20		
Inst_CAR_R	Carpobol	10	11,30	113,00
	Romã	10	9,70	97,00
	Total	20		
Med_CAR_R	Carpobol	10	13,10	131,00
	Romã	10	7,90	79,00
	Total	20		

Test Statistics^b

	Inicial_CAR_R	Inst_CAR_R	Med_CAR_R
Mann-Whitney U	25,000	42,000	24,000
Wilcoxon W	80,000	97,000	79,000
Z	-1,890	-,609	-1,969
Asymp. Sig. (2-tailed)	,059	,542	,049
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,063 ^a	,579 ^a	,052 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Substâncias_CAR_R

NPAR TESTS

```

/M-W= Inicial_R_CLX Inst_R_CLX Med_R_CLX BY Substâncias_R_CLX(1 2)
/STATISTICS=DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS.

```

NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados instrumentação.sav

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Inicial_R_CLX	20	405,5750	227,49073	112,00	942,00
Inst_R_CLX	20	11,6750	17,50284	,00	62,00
Med_R_CLX	20	72,7500	190,13766	,00	640,00
Substâncias_R_CLX	20	1,50	,513	1	2

Mann-Whitney Test**Ranks**

Substâncias_R_CLX		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Inicial_R_CLX	Romã	10	10,80	108,00
	Clorexidina	10	10,20	102,00
	Total	20		
Inst_R_CLX	Romã	10	10,40	104,00
	Clorexidina	10	10,60	106,00
	Total	20		
Med_R_CLX	Romã	10	13,25	132,50
	Clorexidina	10	7,75	77,50
	Total	20		

Test Statistics^b

	Inicial_R_CLX	Inst_R_CLX	Med_R_CLX
Mann-Whitney U	47,000	49,000	22,500
Wilcoxon W	102,000	104,000	77,500
Z	-,227	-,077	-,278
Asymp. Sig. (2-tailed)	,821	,939	,023
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,853 ^a	,971 ^a	,035 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Substâncias_R_CLX

APÊNDICE P - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM A GLICERINA PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

```

REGRESSION
  /MISSING LISTWISE
  /STATISTICS COEFF OUTS R ANOVA
  /CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
  /NOORIGIN
  /DEPENDENT Porcent_Glicerina
  /METHOD=ENTER Conc_Glicerina
  /SCATTERPLOT=(*ZRESID ,*ZPRED)
  /RESIDUALS NORM(ZRESID)
  /SAVE RESID.

```

Regression

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\HD\NOTEBOOK\Doutorado\TESE\Tese_ROMÃ\ESTA
TÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados Artemia.sav

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Concentração de Glicerina - com álcool (mg/mL) ^a	.	Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Model Summary^a

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,957 ^a	,916	,875	6,2507

- a. Predictors: (Constant), Concentração de Glicerina - com álcool (mg/mL)
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	857,544	1	857,544	21,948	,043 ^a
	Residual	78,143	2	39,072		
	Total	935,688	3			

- a. Predictors: (Constant), Concentração de Glicerina - com álcool (mg/mL)
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-2,014	5,186		-,388	,735
	Concentração de Glicerina - com álcool (mg/mL)	35,254	7,525	,957	4,685	,043

- a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

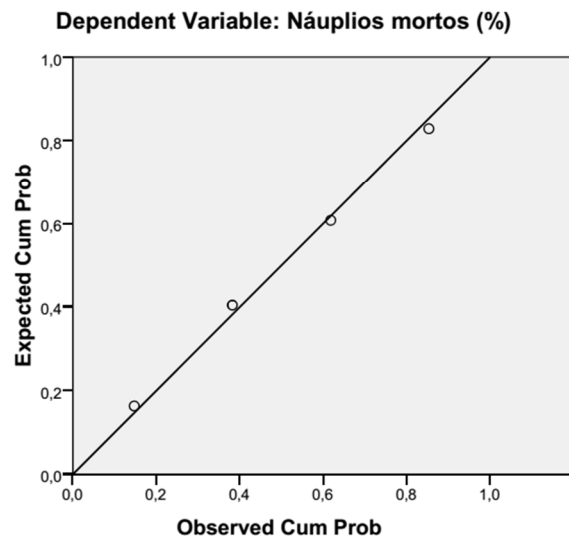
Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	1,511	40,290	17,375	16,9070	4
Residual	-6,1377	5,9384	,0000	5,1037	4
Std. Predicted Value	-,938	1,355	,000	1,000	4
Std. Residual	-,982	,950	,000	,816	4

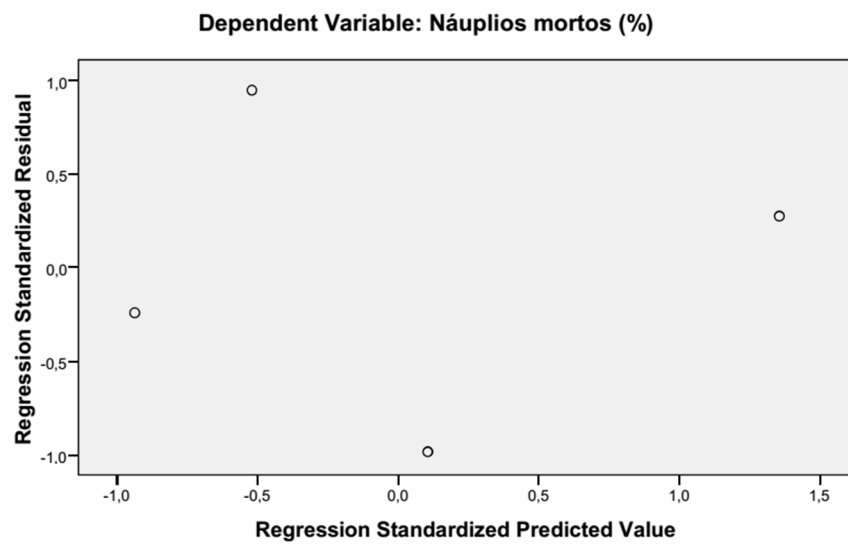
- a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Charts

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Scatterplot



```

EXAMINE VARIABLES=RES_2
/PLOT BOXPLOT STEMLEAF NPPLLOT
/COMPARE GROUP
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.

```

APÊNDICE Q - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM O ÁLCOOL COM GLICERINA PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT Porcent_ÁlcoolGlicerina
/METHOD=ENTER Conc_ÁlcoolGlicerina
/SCATTERPLOT=(*ZRESID ,*ZPRED)
/RESIDUALS NORM(ZRESID)
/SAVE RESID.

```

Regression

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\HD\NOTEBOOK\Doutorado\TESE\Tese_ROMA\ESTA
TÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados Artemia.sav

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Concentração de Álcool - com glicerina (mg/mL) ^a	.	Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,956 ^a	,913	,870	6,3774

- a. Predictors: (Constant), Concentração de Álcool - com glicerina (mg/mL)
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	854,346	1	854,346	21,006	,044 ^a
	Residual	81,342	2	40,671		
	Total	935,688	3			

- a. Predictors: (Constant), Concentração de Álcool - com glicerina (mg/mL)
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-3,344	5,532		-,604	,607
	Concentração de Álcool - com glicerina (mg/mL)	7,083	1,545	,956	4,583	,044

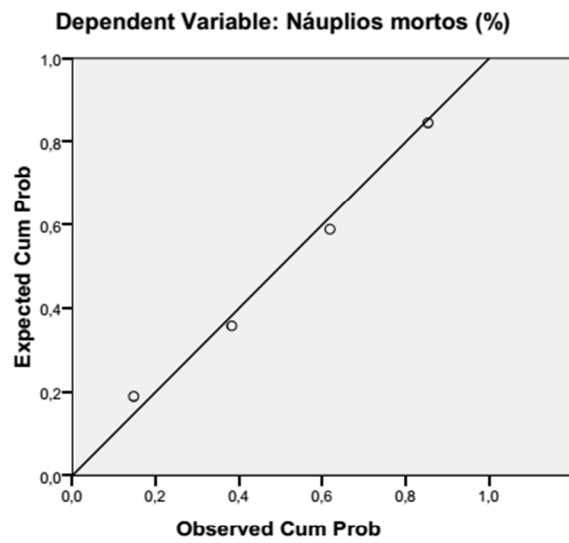
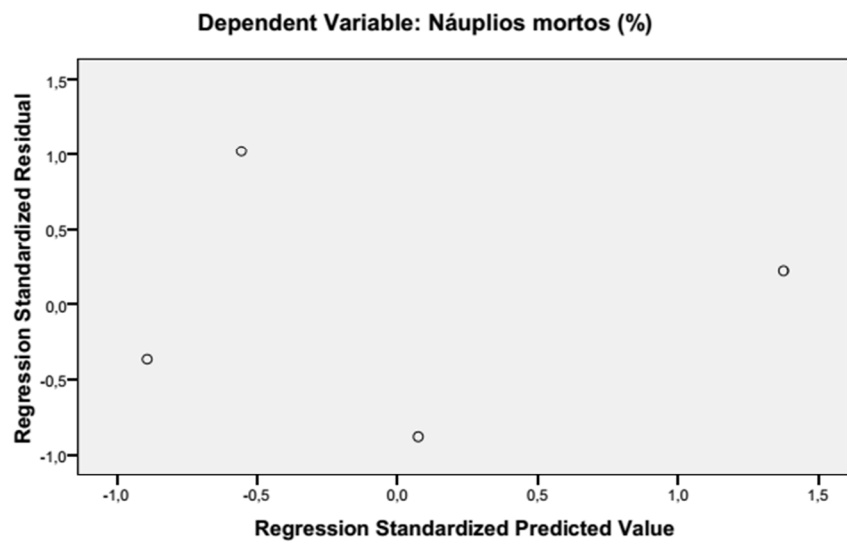
- a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	2,323	40,573	17,375	16,8755	4
Residual	-5,6146	6,5105	,0000	5,2071	4
Std. Predicted Value	-,892	1,375	,000	1,000	4
Std. Residual	-,880	1,021	,000	,816	4

- a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Charts

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual**Scatterplot**

```
EXAMINE VARIABLES=RES_3
/PLOT BOXPLOT STEMLEAF NPLOT
/COMPARE GROUP
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

APÊNDICE R - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM A SOLUÇÃO ALCOÓLICA PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT Porcent_Sol_Alcoólica
/METHOD=ENTER Conc_Sol_Alcoólica
/SCATTERPLOT=(*ZRESID ,*ZPRED)
/RESIDUALS NORM(ZRESID)
/SAVE RESID.

```

Regression

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\HD\NOTEBOOK\Doutorado\TESE\Tese_ROMA\ESTA TÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados Artemia.sav

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Concentração da Solução Alcoólica (mg/mL) ^a	.	Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,994 ^a	,989	,983	2,2362

- a. Predictors: (Constant), Concentração da Solução Alcoólica (mg/mL)
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	883,347	1	883,347	176,652	,006 ^a
	Residual	10,001	2	5,000		
	Total	893,348	3			

- a. Predictors: (Constant), Concentração da Solução Alcoólica (mg/mL)
b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-3,693	1,940		-1,904	,197
	Concentração da Solução Alcoólica (mg/mL)	7,203	,542	,994	13,291	,006

- a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

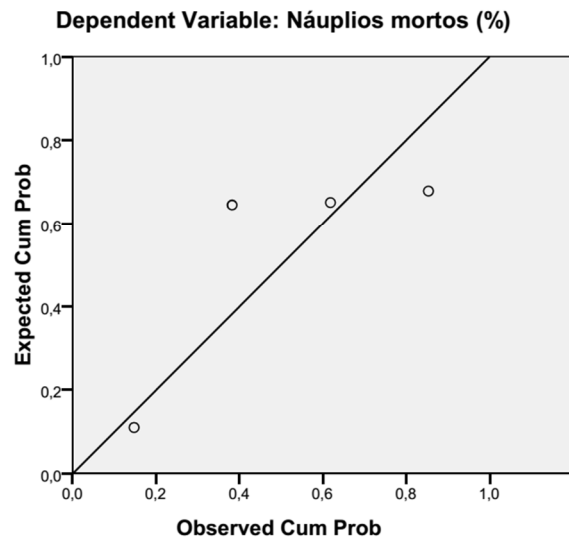
Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	2,069	40,964	17,375	17,1595	4
Residual	-2,7355	1,0364	,0000	1,8258	4
Std. Predicted Value	-,892	1,375	,000	1,000	4
Std. Residual	-1,223	,463	,000	,816	4

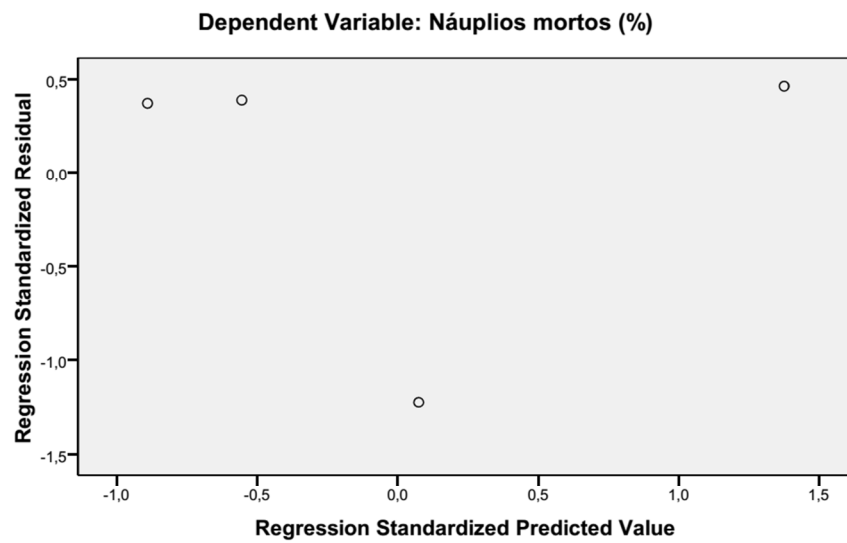
- a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Charts

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Scatterplot



```

EXAMINE VARIABLES=RES_4
/PLOT BOXPLOT STEMLEAF NPLOT
/COMPARE GROUP
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.

```

APÊNDICE S - REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS OBTIDOS COM O EXTRATO PARA ANÁLISE DE TOXICIDADE POR MEIO DE DA DETERMINAÇÃO DE LETALIDADE EM MICROCRUSTÁCEO

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT Porcent_Romã
/METHOD=ENTER Conc_Romã
/SCATTERPLOT=(*ZRESID ,*ZPRED)
/RESIDUALS NORM(ZRESID)
/SAVE RESID.

```

Regression

[DataSet1] C:\Users\Fabiane\Desktop\HD\NOTEBOOK\Doutorado\TESE\Tese_ROMÃ\ESTATÍSTICA TESE\RESULTADOS SPSS\Dados Artemia.sav

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Concentração do Extrato de P. granatum (mg/mL) ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Model Summary^a

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,980 ^a	,961	,922	5,1517

a. Predictors: (Constant), Concentração do Extrato de P. granatum (mg/mL)

b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	654,307	1	654,307	24,654	,127 ^a
	Residual	26,540	1	26,540		
	Total	680,847	2			

a. Predictors: (Constant), Concentração do Extrato de P. granatum (mg/mL)

b. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2,542	6,303		,403	,756
	Concentração do Extrato de P. granatum (mg/mL)	,757	,153	,980	4,965	,127

a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

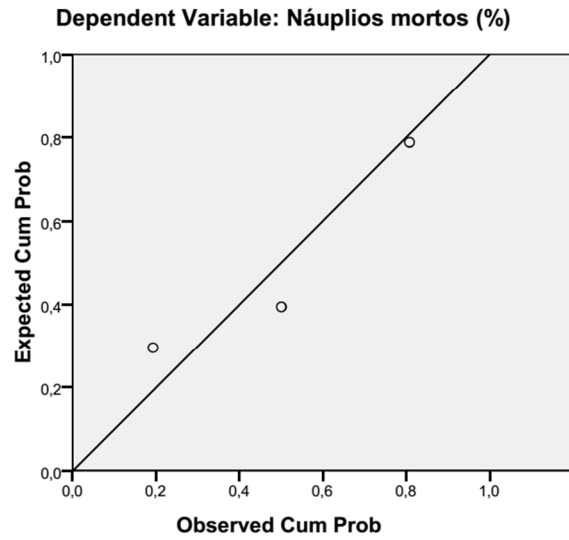
Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	14,356	49,874	30,133	18,0874	3
Residual	-2,7562	4,1299	,0000	3,6428	3
Std. Predicted Value	-,872	1,091	,000	1,000	3
Std. Residual	-,535	,802	,000	,707	3

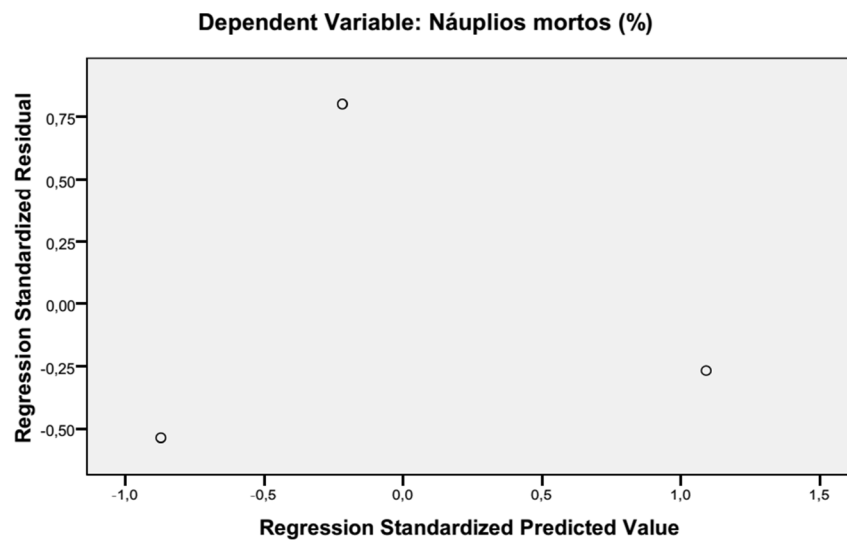
a. Dependent Variable: Náuplios mortos (%)

Charts

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Scatterplot



```

EXAMINE VARIABLES=RES_1
  /PLOT BOXPLOT STEMLEAF NPLOT
  /COMPARE GROUP
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /CINTERVAL 95
  /MISSING LISTWISE
  /NOTOTAL.

```