



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
DA AMAZÔNIA LEGAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
PPG-BIONORTE**

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE PASTAS
ENDODÔNTICAS À BASE DE EXTRATO GLICÓLICO DE
*Musa paradisiaca***

MAURÍCIO BACARIN SILVA

MANAUS, 2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
PPG-BIONORTE**

MAURÍCIO BACARIN SILVA

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE PASTAS
ENDODÔNTICAS À BASE DE EXTRATO GLICÓLICO DE
*Musa paradisiaca***

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (área de concentração: Biotecnologia; linha de pesquisa: bioprospecção e desenvolvimento de bioprocessos e bioprodutos), da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

Ficha Catalográfica

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

S586a Silva, Maurício Bacarin
Avaliação da biocompatibilidade de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* / Maurício Bacarin Silva . 2018
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Musa. 2. Teste de Materiais. 3. Preparações Farmacêuticas Odontológicas. 4. Genotoxicidade. 5. Endodontia. I. Pereira, José Odair. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MAURÍCIO BACARIN SILVA

**"AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE PASTAS ENDODÔNTICAS À
BASE DE EXTRATO GLICÓLICO DE *Musa paradisiaca*".**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): **Prof. Dr. José Odair Pereira**

Co -orientador(a):

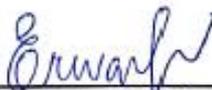
Banca Examinadora:



Prof.-Dr. José Odair Pereira (UFAM)
Orientador – Presidente da banca



Profa. Dra. Sueli Patricia Harumi Miyagi de Cara (FMU-SP)
Membro



Prof. Dr. Erivan Clementino Gualberto Júnior (UFAM)
Membro



Profa. Dra. Carina Toda (UFAM)
Membro



Profa. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido (UFAM)
Membro

MANAUS – AMAZONAS
Dezembro/2018

“(…)

Giro um simples compasso e num círculo eu faço o mundo.

Um menino caminha e caminhando chega no muro

E ali logo em frente, a esperar pela gente, o futuro está.

(…)”

“Aquarela”

letra de Vinícius de Moraes

música de Antônio Carlos Pecci (Toquinho)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos cirurgiões-dentistas, nutridos pelos sorrisos que transformam, trazendo alegria para cada família, o que os motiva na busca pelo aprimoramento da sabedoria, cuja fonte é DEUS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. José Odair Pereira pela orientação e por sua disponibilidade em ajudar sempre.

Agradeço à Profa. Dra. Márcia Martins Marques e toda sua equipe do Laboratório de Pesquisa Básica “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOU SP, que abriu os braços e me acolheu, compartilhando sua experiência e conhecimento.

Agradeço ao Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus, diretor técnico da empresa MAPRIC[®], pelo apoio à pesquisa acadêmica, já que gentilmente cedeu amostra do extrato glicólico de *Musa paradisiaca* para os experimentos deste trabalho.

Agradeço a todos os professores, estudantes e toda equipe profissional do Programa de Pós-graduação da rede BIONORTE pela amizade e parceria, um abraço a todos.

RESUMO

Introdução: O tratamento endodôntico de decíduos e permanentes necessita de alternativa com melhor desempenho clínico contra infecções endodônticas refratárias. A Etnobotânica indica usos terapêuticos da *Musa paradisiaca* (bananeira) em comunidades tradicionais. Biomoléculas naturais do extrato glicólico de banana (EGB) apresentam atividade antimicrobiana, flavonoides e triterpenos com potencial de imunomodulação, segundo nossos estudos anteriores. Propôs-se uma pasta endodôntica de EGB associado ao Ca(OH)_2 e/ou ao ZnO. Avaliou-se a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* submetendo culturas de fibroblastos de mucosa mastigatória (FMM1) às pastas endodônticas propostas e seus componentes isolados para assegurar preliminarmente sua biocompatibilidade *in vitro*. A hipótese nula foi que as pastas endodônticas não seriam citotóxicas nem genotóxicas *in vitro*.

Métodos: Os grupos experimentais foram: 1)EGB; 2)ZnO; 3)Ca(OH)₂; 4)EGB+ZnO; 5)EGB+Ca(OH)₂; 6)EGB+ZnO+Ca(OH)₂; 7)Controle Positivo (DMEM). Cada grupo condicionou o meio de cultura durante 24h. Para avaliar a citotoxicidade pelo ensaio do tetrazólio MTT (n=3) foram diluídos os meios condicionados a 50%, 10% e 5% e dispostos sobre as células cultivadas. Após 24h a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (540 nm). Para o ensaio da resazurina (AlamarBlue™) (n=8) a detecção da fluorescência no espectrofotômetro foi utilizada para a diluição de 10%. Para genotoxicidade (n=3) os micronúcleos foram observados por microscopia de fluorescência com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-Vectashield®). Os resultados foram avaliados pela estatística descritiva, pelos testes Tukey e ANOVA ($p < 0,05$).

Resultados: As pastas endodônticas apresentaram viabilidade celular satisfatória ($p \leq 0,0001$). MTT: a viabilidade celular aumentou proporcionalmente com a diluição dos grupos experimentais. Resazurina: Ca(OH)₂ estatisticamente semelhante ao controle. Grupos 2, 4, 5 e 6 foram estatisticamente semelhantes. EGB obteve 68% de viabilidade celular. Nenhum grupo apresentou genotoxicidade.

Conclusões: EGB e novas pastas endodônticas propostas à base de EGB são biocompatíveis *in vitro*.

Descritores: Teste de Materiais. Genotoxicidade. Preparações Farmacêuticas Odontológicas. *Musa*. Materiais Biocompatíveis.

ABSTRACT

Introduction: Root canal treatment of permanent and deciduous teeth requires an alternative to improve clinical performance against refractory infection. Ethnobotanical studies have described the use of *Musa paradisiaca* (banana) in traditional communities. Natural biomolecules of banana glycolic extract (BGE) show antimicrobial properties, flavonoids, and triterpenes with immunomodulatory potential, as presented in our previous researches. New endodontic pastes comprised of BGE associated with calcium hydroxide (Ca(OH)₂) and/or zinc oxide (ZnO) and its components alone were evaluated by cytotoxicity and genotoxicity *in vitro* assay using cultured gingival fibroblasts. The null hypothesis was that the endodontic pastes would not be cytotoxic or genotoxic *in vitro*.

Methods: Seven experimental groups were tested: BGE; ZnO; Ca(OH)₂; BGE+ZnO; BGE+Ca(OH)₂; BGE+ZnO+Ca(OH)₂; and positive control (Dulbecco's modified Eagle medium). Each group conditioned the culture medium for 24 h. Cytotoxicity (n=3) was assessed by tetrazolium assay diluting the conditioned media at 50%, 10% and 5% and then disposing over the cells. The absorbance (540nm) was determined after 24h. Fluorescence detection on a spectrophotometer was used for resazurin (AlamarBlue™) assay (n=8) at 10% media dilution. For genotoxicity (n=3), micronuclei were counted using fluorescence microscopy with a mounting medium of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI-Vectashield®). Results were analyzed using descriptive statistics, Tukey's test and ANOVA ($p < 0.05$).

Results: All endodontic pastes presented satisfactory cell viability rates ($p \leq 0.0001$). MTT: cell viability proportionally increased with experimental groups dilution. Resazurin: Ca(OH)₂ showed statistically similar rates to those of the control group. The ZnO, BGE+ZnO, BGE+Ca(OH)₂, and BGE+ZnO+Ca(OH)₂ groups showed statistically similar results. The BGE group showed 68% of cell viability. None of the groups presented genotoxicity.

Conclusions: BGE and BGE-based endodontic pastes showed biocompatibility *in vitro*.

Keywords: Material testing. Genotoxicity. Dental pharmaceutical preparations. *Musa*. Biocompatible materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Bananeira	20
Figura 1.2	Bananeira; coração surgindo do cacho de bananas	21
Figura 1.3	Diagrama da bananeira	22
Figura 4.1	Preparo do meio de cultura	53
Figura 4.2	Métodos do ensaio de resazurina	56
Figura 4.3	Ensaio de genotoxicidade	57
Figura 5.1	Resultado ensaio MTT	59
Figura 5.2	Gráfico dos dados do ensaio de viabilidade celular de tetrazólio	60
Figura 5.3	Gráfico dos dados do ensaio de viabilidade celular de resazurina	61
Figura 5.4	Leitura de microplaca do ensaio de resazurina	62
Figura 5.5	Fotomicrografia de micronúcleo	63

LISTA DE TABELA E QUADROS

Tabela 5.1	Dados obtidos pelo ensaio de genotoxicidade	63
Quadro 4.1	Grupos Experimentais	50
Quadro 4.2	Diluição dos Meios de Cultura Condicionados	54
Quadro 4.3	Fórmula Matemática do Cálculo da Viabilidade Celular	55
Quadro 5.1	Ensaio de tetrazólio (MTT): Resultado do teste de Tukey	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EGB	Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i> (banana)
PEG	Polietilenoglicol 400
FMM1	Fibroblastos imortalizados de mucosa mastigatória humana
DMEM	Meio de Eagle de alto teor de glucose modificado por Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (ThermoFisher® Scientific, Waltham, MA, EUA)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (Vectashield® Vector, Burlingame, CA, EUA)
PBS	Tampão fosfato salino
ERO	Espécies reativas de oxigênio
LPS	Lipopolissacarídeos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
RANK	Receptor do ligante NF-κB
RANKL	Ativador do receptor do ligante NF-κB
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INF-γ	Interferon gama
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
ENCTI	Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. RETROSPECTIVA e PERSPECTIVAS DE NOSSOS ESTUDOS, ETNOBOTÂNICA e a <i>Musa paradisiaca</i>	14
1.1 A Bananeira	19
1.2 Componentes químicos da Bananeira	22
1.3 Medicina tradicional sobre a Bananeira	27
1.4 Aplicações potenciais de Bioprodutos da Bananeira.....	30
2. PASTAS ENDODÔNTICAS PARA DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES.....	38
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo Geral	49
3.2 Objetivos Específicos.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Pastas Endodônticas de Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i>	50
4.2 Cultivo Celular.....	51
4.3 Condicionamento do Meio de Cultura Celular.....	53
4.4 Viabilidade Celular: ensaio de tetrazólio (MTT) em várias diluições	53
4.5 Viabilidade Celular: ensaio de resazurina (AlamarBlue™).....	55
4.6 Genotoxicidade: ensaio de micronúcleos (Vectashield® - DAPI)	57
4.7 Análise Estatística.....	58
5. RESULTADOS.....	58
5.1 Viabilidade Celular: ensaio de tetrazólio (MTT) em várias diluições	58
5.2 Viabilidade Celular: ensaio de resazurina (AlamarBlue™).....	61
5.3 Genotoxicidade: ensaio de micronúcleos (Vectashield® - DAPI)	62
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO	74
8. REFERÊNCIAS	75
9. ANEXOS	81
ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	81
ANEXO B: Cadastro no SISGEN	82
ANEXO C: Certificado de Análise do EGB - MAPRIC®	83

INTRODUÇÃO

Considerando a evolução da Biotecnologia aplicada à Endodontia, está próximo o advento de biomateriais que substituam as limitações dos produtos disponíveis para as técnicas atualmente preconizadas. Diferentes materiais têm sido aplicados como medicação intracanal, no entanto os produtos naturais provenientes de fermentações e dos extratos de plantas estudados pela Etnobotânica podem ser responsáveis não apenas por uma melhor biocompatibilidade, como também por um incremento na propriedade terapêutica. Essas características são prioritárias na Endodontia, já que materiais que permanecem no canal radicular podem manter uma resposta inflamatória crônica por tempo indeterminado (SILVA et al., 2016). As técnicas de preenchimento dos canais radiculares, que necessitem de intervenções endodônticas, podem causar a extrusão desses materiais além do limite apical. Ainda que não haja a extrusão acidental, a eluição de componentes derivados dos materiais endodônticos deve ser considerada. Portanto, o sucesso clínico está diretamente relacionado com a menor irritação tecidual dos materiais endodônticos (ELDENIZ et al., 2015).

A *Musa paradisiaca* (bananeira) tem várias aplicações já descritas e tem sido alvo de novas pesquisas para validar cientificamente suas propriedades curativas e antimicrobianas (BENNETT et al., 2010; GIORGETTI; ROSSI; RODRIGUES, 2007; JANG et al., 2002; JESUS et al., 2004; JONES, 1965; MARTINS et al., 2009; MATHEW; NEGI, 2017; MONDAL et al., 2001; SWANSON et al., 2010; VIJAYAKUMAR; PRESANNAKUMAR; VIJAYALAKSHMI, 2008; YANG et al., 2000) podendo ter importante papel como biomaterial inovador. Apesar das plantas serem utilizadas no tratamento de sintomas e cura de doenças que afetam a população, dentre elas a doença cárie (ALBUQUERQUE et al., 2007; COE; ANDERSON, 1999; COELHO-FERREIRA, 2009; GOMES, 2008; KALA, 2005; MACIEL; GUARIM NETO, 2006; MEDEIROS; FONSECA; ANDREATA, 2004), há uma escassez de estudos de *Musa paradisiaca* na Odontologia.

Nossos estudos anteriores sobre o Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (Banana - EGB) como veículo em novas pastas endodônticas propostas relatam atividade antimicrobiana e um perfil micromolecular do EGB com biomoléculas que poderiam contribuir no tratamento endodôntico (SILVA, 2018). Foram encontradas citações de estudos na Indonésia que relatam o efeito cicatrizante de extrato metanólico do rizoma de *Musa paradisiaca* Linn melhorando o reparo de feridas de queimaduras em ratos albinos Wistar (AMUTHA; SELVAKUMARI,

2014). A atividade antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, patógenos da doença periodontal, foi sugerida por um estudo com o extrato alcóolico da casca de banana, ressaltando-se que os autores discutem se a atividade antimicrobiana não sofreu interferência do álcool usado para elaborar o extrato do experimento sobre os resultados obtidos (KAPADIA; PUDAKALKATTI; SHIVANAİKAR, 2015).

A inovação em bioprodutos no tratamento endodôntico demanda etapas obrigatórias para possibilitar seu uso clínico. Nossos estudos anteriores apresentaram resultados que sugerem atividade antimicrobiana e identificaram componentes com potencial bioatividade imunomoduladora nas propostas de novas pastas endodônticas (SILVA, 2011, 2018; SILVA et al., 2013). Portanto, com o intuito de verificar a biocompatibilidade de novas pastas endodônticas à base de Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* com Ca(OH)_2 e/ou ZnO e de seus componentes, propôs-se avaliar *in vitro* a citotoxicidade por meio do ensaio de tetrazólio (MTT) e do ensaio de resazurina e a genotoxicidade por meio do ensaio de micronúcleos. A hipótese nula é que tanto as pastas endodônticas propostas, quanto os seus componentes isolados EGB, Ca(OH)_2 e ZnO não apresentariam citotoxicidade e genotoxicidade.

1. RETROSPECTIVA e PERSPECTIVAS DE NOSSOS ESTUDOS, ETNOBOTÂNICA e a *Musa paradisiaca*

A prospecção do leite de banana, ou seja, da seiva da bananeira foi inicialmente o foco para encontrar bioativos em nossos experimentos pilotos anteriores não publicados, no entanto para ter sucesso na obtenção do extrato da seiva era necessário o uso de álcool, não sendo um extrato com propriedades físicas que suprissem os objetivos que procurávamos na bioprospecção de bioprodutos para o tratamento endodôntico. Considerando a existência de um produto para fins cosméticos já disponível no mercado bioindustrial, nosso grupo optou pela parceria inicial com esse setor para oportunizar a bioprospecção de um novo material para uso endodôntico de origem natural, sendo agora o utilizado o fruto da bananeira para elaborar o extrato.

O Extrato Glicólico de Banana (EGB) proveniente do fruto da bananeira é obtido por percolação com propilenoglicol, obtivemos a parceria da empresa MAPRIC[®] que gentilmente nos cedeu o EGB para nossos estudos. A parceria entre a Academia e a Indústria é um avanço

para a Biotecnologia na viabilização de um produto comercialmente viável a ser bioprospectado. No Brasil, a Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (ENCTI) para o período de 2016 a 2022 convoca ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I), em especial a Biotecnologia para a saúde humana, com a finalidade de reduzir os impactos das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) sobre a população (BRASIL, 2016). A Organização Pan-americana de Saúde considera a Saúde Bucal associada com os fatores de risco das DCNT (OPAS, 2017), as quais possuem prioridade para a prevenção e controle no Plano de Ação Global entre os anos de 2013 e 2020 da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2013). As patologias da polpa e tecido periapical interferem na qualidade de vida do indivíduo e sua evolução pode ter repercussões graves para a saúde, como a celulite facial, que caso não seja tratada pode resultar em trombose do seio cavernoso, obstrução das vias aéreas, mediastinite aguda, supuração pleuropulmonar, bacteremia sistêmica (NEVILLE et al., 2016; HARGREAVES; BERMAN, 2017). A ENCTI busca o fortalecimento de redes e infraestruturas de pesquisa e pretende que haja articulação para o desenvolvimento científico e tecnológico em insumos para saúde, inclusive biofármacos e biomateriais, de forma a assegurar o domínio tecnológico de sua produção, superando os atuais desafios para os produtos provenientes da Biotecnologia para a saúde (BRASIL, 2016).

As características do propilenoglicol usado na técnica de percolação podem classificar o EGB como um veículo hidrossolúvel viscoso (NELSON FILHO et al., 1999). O pH do EGB é ácido e ele possui propriedades físicas interessantes para compor pastas endodônticas no tratamento de dentes permanentes como medicação intracanal, podendo ser considerada no caso de dentes decíduos sua aplicação também como veículo de pasta obturadora. Sua aplicação intracanal direta, sem associação com o pó de óxido de zinco (ZnO) e de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) para compor pastas, com o intuito de ação das biomoléculas presentes em técnica endodôntica de sessão única ou múltipla é também uma alternativa a ser considerada.

Em meio ao exposto, pastas endodônticas à base de EGB, que substituiu os veículos inertes comumente utilizados no tratamento endodôntico, foram avaliadas experimentalmente, associando o ZnO e o Ca(OH)₂. Em nossa pesquisa anterior, as propriedades antimicrobianas dessas novas pastas endodônticas à base de EGB foram avaliadas pelo método de poços em difusão em ágar frente a *Enterococcus faecalis*, bactéria associada a infecções endodônticas refratárias, com resultado estatisticamente significativo quando se associou o EGB com óxido de zinco, enquanto as pastas que continham Ca(OH)₂ não apresentaram atividade nessa metodologia utilizada, talvez o ambiente alcalino ative mecanismos de defesa da biologia

celular do *Enterococcus faecalis* aumentando sua resistência (SILVA et al., 2013). Avaliamos também, em nossos estudos anteriores, o EGB por meio de Cromatografia de Camada Delgada sugerindo a presença de flavonoides, taninos, esteroides e terpenos (SILVA, 2018).

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do EGB em nossos estudos anteriores inferiu terpenos e indicou a presença de grande quantidade de carboidratos. Lançando mão da Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray* foi proposta a maltose como constituinte majoritário do EGB. Em princípio os açúcares deveriam servir como nutrientes para os microrganismos e auxiliariam sua proliferação. No entanto, o efeito foi contrário na avaliação antimicrobiana por meio de difusão em ágar das pastas endodônticas contra *Enterococcus faecalis*, ao ser verificada a inibição de crescimento em tapete sobre o meio ágar Mueller Hinton (MHA) quando avaliado apenas o EGB e atividade bactericida associando-se EGB ao ZnO no teste de difusão em ágar (SILVA, 2018).

Na hipótese de a grande quantidade de maltose presente no EGB ter um papel em suas propriedades, assume-se aqui a importância de uma possível relação do sistema maltose conforme estudado para a *Escherichia coli*. Este sistema persistiu como um exemplo de regulação positiva de um grupo de genes e sua provável conexão entre o metabolismo da maltose e a suscetibilidade de *E. coli* pela infecção do vírus “phage λ ”. Descobriu-se o receptor (LamB) responsável pela ligação de “ λ ” durante o estudo para sua atividade sobre *E. coli* e, ainda, foi demonstrado que essa proteína externa de sua membrana citoplasmática constituía um canal para a passagem de açúcares através dela. Tem sido demonstrada a participação direta do carreador na regulação transcripcional, indicando sua influência na expressão de genes de bactérias, a qual possui alguma dependência das taxas de entrada de substrato e também da própria presença física do mesmo. Portanto, presume-se que a presença de maltose pode ter oportunizado a ação de moléculas que produzam o efeito bactericida, podendo estar presentes no EGB ou na própria bactéria, ou ainda desativando moléculas que seriam importantes para a defesa da bactéria (SILVA, 2018). Esses achados consolidam a escolha do EGB como um potencial veículo alternativo adequado para uso em novos produtos endodônticos.

Além da atividade antimicrobiana, fundamental para as pastas endodônticas, é notória a existência de reagentes em potencial para novos fármacos de origem natural apresentando diferentes propriedades medicinais. A presença de flavonoides, taninos, esteroides e terpenos, encontradas no EGB (SILVA, 2018), possuem potencial terapêutico a ser considerado para agregar melhores propriedades clínicas nas pastas endodônticas. As drogas isoladas da espécie *Musa acuminata* foram consideradas válidas para terapêutica de inflamação em uma recente

revisão, apresentando atividade anti-inflamatória em células de tumores humanos e, ainda, o potencial de imunestimulação foi demonstrado em experimentos com animais, além de ensaios clínicos conduzidos que comprovaram a sua eficácia em aliviar a inflamação associada com a medicina ocidental em pacientes hipertensos com angina pectoris (MATHEW; NEGI, 2017).

O papel do sistema imunológico pode refletir na resolução das doenças da polpa dentária e influi diretamente sobre o sucesso do tratamento endodôntico. O uso de medicações intracanal imunomoduladoras têm sido alvo para o aprimoramento das técnicas atualmente utilizadas com a finalidade de induzir resposta imune favorável ao reparo do tecido perirradicular, sendo tão relevante quanto sua atividade antimicrobiana (COTTI et al., 2014a). As medicações intracanal tradicionalmente eleitas para debelar as infecções endodônticas não possuem todas propriedades requeridas para eliminar patógenos resistentes e promover o reparo tecidual, sendo que algumas pastas usadas para esse fim utilizam veículos inertes como o soro fisiológico, água destilada, propilenoglicol, polietilenoglicol, oliva, óleo de silicone, entre outros. As inflamações crônicas imuno-inflamatórias e, conseqüentemente, reabsorção óssea local, causadas em resposta a microrganismos responsáveis por infecções refratárias são alvo para o desenvolvimento de novas alternativas que incluam ferramentas biomoleculares (SOARES et al., 2015). Dentre muitas moléculas bioativas do EGB, existem flavonoides e triterpenos já identificados (SILVA, 2018) e que podem ser eficientes em biomodular as reações imunes na área infectada das patologias ósseas, assim como promover cicatrização e neoformação óssea.

Revisando as patologias do tecido ósseo, os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea fisiológica e patológica. Embora muitos hormônios sistêmicos e citocinas locais regulem a diferenciação dos osteoclastos, o ativador do receptor do ligante NF- κ B (RANKL) e o fator estimulante de colônias de macrófagos são as moléculas mais importantes na osteoclastogênese. Os sinais de RANKL que são produzidos pelas células do estroma da medula óssea ou osteoblastos são introduzidos nos precursores dos osteoclastos, via um receptor de RANKL (RANK) na membrana plasmática das células da linhagem dos osteoclastos, levando à ativação de NF- κ B. Em síntese, desse modo, a expressão de moléculas relacionadas à diferenciação de osteoclastos é induzida (LIMA et al., 2015c, HARGREAVES; BERMAN, 2017).

A periodontite apical é uma doença inflamatória que induz a produção de citocinas pró-osteoclastogênicas, inclusive RANKL, TNF- α e interleucinas, produzindo reabsorção óssea e também espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar dano a proteínas, lipídeos e ao

DNA circunvizinho, além disso, as ERO possuem um papel na angiogênese, miogênese e adipogênese. Os lipopolissacarídeos (LPS) provenientes de infecções microbianas podem ser os desencadeadores da reabsorção óssea, que a seguir é sustentada pelo próprio processo inflamatório do organismo (LIMA et al., 2015c; HARGREAVES; BERMAN, 2017).

Um estudo com flavonoide derivado de *Citrus sudachi* mostrou que essa molécula bloqueou a destruição óssea inflamatória induzida por LPS por inibir diretamente a diferenciação dos precursores de osteoclastos, sem qualquer efeito sobre os osteoblastos. Além disso, o flavonoide reprimiu as vias principais de sinalização para a diferenciação de osteoclastos, enquanto simultaneamente diminuiu a produção de ERO intracelular. Portanto, o flavonoide pode ser um agente terapêutico útil para o tratamento de doenças ósseas inflamatórias (OHYAMA et al., 2018).

Com a hipótese que flavonoides poderiam apresentar papel no desenvolvimento ósseo, outro estudo foi desenvolvido com quercetina e rutina, comumente encontrados em frutas e vegetais. Foram utilizadas células mesenquimais isoladas e caracterizadas para a diferenciação em osteoblastos. Os flavonoides aumentaram a taxa de diferenciação das células em osteoblastos, como também aumentaram significativamente a atividade da fosfatase alcalina comparada ao grupo controle. A expressão de marcadores moleculares que são ligados a diferenciação dos osteoblastos foi maior para osteopontina, osterix, RunX2, osteoprotegerina e osteocalcina. Os autores afirmam que essa classe de flavonoides poderia ser usada para o tratamento de desordens osteodegenerativas pela sua especificidade na atividade de diferenciação de osteoblastos (SRIVASTAVA; BANKAR; ROY, 2013).

Em outro estudo de extrato natural com a hipótese de seu uso terapêutico na osteoporose, avaliou-se *in vivo* a implicação no metabolismo ósseo do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L (mastruz), composto também por flavonoides e terpenos, em murinos fêmeas ovariectomizados. Na osteoporose há a inativação de osteogênese e incremento da atividade osteoclástica pelo aumento de IL-1, IL-6 e TNF (SOARES et al., 2015). Correlacionando com a Endodontia, o infiltrado inflamatório de lesões periapicais infecciosas contém INF- γ que, conseqüentemente, gera o aumento de IL-1 e TNF- α , também responsáveis por desencadear o processo de reabsorção óssea (LIMA et al., 2015b). O estudo sugere que os componentes bioativos do extrato de mastruz provavelmente atuam em nível celular com a ativação de osteoblastos e inibição de osteoclastos, ressaltando ainda que os flavonoides devem participar da ativação de osteoblastos ao se ligarem aos receptores de estrógeno dessas células (SOARES et al., 2015).

A pesquisa sobre a *Musa paradisiaca* se torna um fator importante na tentativa de consolidar a correlação com outras plantas que possuem moléculas bioativas descritas anteriormente na literatura. Com vistas ao embasamento científico deste estudo, procurou-se fazer um levantamento cronológico da literatura que pudesse elucidar o comportamento biológico terapêutico dos constituintes de *Musa paradisiaca*, bem como apresentar suas características botânicas e seu uso medicinal em diversas comunidades.

1.1 A Bananeira

Braga (1949), em um levantamento botânico das “Plantas do Ceará”, catalogou a *Musa paradisiaca*. As matrizes selvagens das bananeiras cultivadas parecem localizar-se na Ásia, desde as Índias às Filipinas – incluindo a Malásia. O fruto comestível não era conhecido na América pré-colombiana, foram trazidas da África e da Ásia no início da colonização, entretanto Gabriel Soares em seu “Tratado Descritivo do Brasil”, no ano de 1587, cita a “pacoba” como natural da terra, sendo conhecido naquela época como “banana” apenas variedades exóticas originárias de São Tomé. No Amazonas, “pacova” são consideradas as bananas da terra, enquanto que nas Guianas conhece-se a variante “bacove”, remetendo ao termo tupi “pac-oba” cujo significado seria “folha de enrolar” ou “que se enrola” ligado às bananeiras ou Musáceas. Enquanto os portugueses as apelidavam de “figos”, referindo-se às variedades comestíveis, da Guiné e arredores veio a origem do nome “banana” generalizada para “todas as castas desta preciosa fruta”, conforme Jacques Raimundo no ano de 1933 em seu livro: “O Elemento Afro-Negro na Língua Portuguesa”. A bananeira é da família das Musáceas, com muitas espécies, mas três principais de cultivo no Brasil: *Musa cavendishii* (cultivares: banana baé, nanica, caturra, banana d’água, anã), *Musa paradisiaca* (cultivares: banana da terra, comprida, chifre de boi, pacova), *Musa sapientum* (cultivares: banana prata, banana maçã, banana curuda, banana São Tomé, banana roxa, banana piroá). A composição química da polpa do fruto maduro da Banana da Terra teria os teores médios de 66,8% água, 1,6% de proteínas, 0,2 % de matérias graxas, 29,9% de açúcar e amido, 0,9% de celulose, 1,1 de cinza. Destaca-se a banana em comparação a outros alimentos cultiváveis no valor energético obtido por acre cultivado com 8.320.000 cal, bem como a sua produção 32.000 libras por acre. Sua importância comercial é grande tendo em vista o grande potencial de energia alimentar e a resistência ao transporte com baixo preço, universalizando-se o consumo da banana. A seguir descreve-se a espécie de *Musa paradisiaca* (Figura 1.1):

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



Figura 1.1. Bananeira; o rizoma é capaz de lançar rebentos que formam novos pseudocaulos, agrupando-se em moitas.

Fonte: Parchen <<http://www.flickr.com/photos/parchen/3573751999/sizes/o/in/photostream/>>. Acesso em: 02 de maio de 2011.

Alves (1999) e Moreira (1999) descreveram a *Musa paradisiaca*, herbácea naturalmente encontrada em regiões tropicais úmidas e subtropicais. Apresenta seu tronco sob o solo, denominado rizoma, de onde provêm as bainhas das folhas em conjunto, que emergem formando o pseudocaule, popularmente conhecido como o tronco da bananeira. Sua multiplicação acontece por meio do lance de novos rebentos por via vegetativa (Figura 1.1). As flores em cachos surgem do coração da bananeira (Figura 1.2). Curiosamente, os frutos são partenocárpicos e não desenvolvem sementes em seu interior, os pontos escuros correspondem a óvulos não desenvolvidos. Sua fase de gestação inicia-se com a formação de um broto-rebento

em outra bananeira. Por esse motivo, sempre ao redor de uma bananeira adulta encontrar-se-ão outras bananeiras em diversos estágios do ciclo de vida, formando uma touceira.



Figura 1.2. Bananeira; coração surgindo do cacho de bananas.

Ennos et al. (2000) examinaram anatômica e morfológicamente o pecíolo e a folha de *Musa textilis*, utilizando também uma abordagem mecânica quantitativa. As bananeiras são perenes com rebentos que emergem de rizomas ensoberbecidos substanciais. Os pecíolos se arranjam em espiral nos rebentos aéreos e suas bases sobrepostas formam um pseudocaulo robusto, através do centro do mesmo cresce a inflorescência terminal. Bem ao alto os pecíolos separam-se do pseudocaulo curvando-se para suportar as enormes folhas ovaladas em um ângulo oblíquo. O esquema estrutural do pecíolo é altamente eficiente, mesmo sem tecido composto por madeira e sendo muito leve, tem a capacidade de suportar as grandes folhas, resistindo a ventos fortes, inclusive a furacões, se curvando e voltando à posição anterior praticamente ileso. Sua armação oca e elementos de reforço longitudinais produzem uma estrutura de baixa densidade e alta flexibilidade. Essa resistência flexural é aprimorada pelo formato em “U” observado no corte transversal do pecíolo (Figura 1.3), de modo que quando deformado para uma direção tende a reverter o movimento na direção oposta, tendo ainda a capacidade de ser muito complacente quando submetido à torção. Enquanto isso as estruturas internas orientadas como raios e as placas laterais de parênquima estrelado previnem achatamento dorsoventral, permitindo uma flexão ainda maior do pecíolo sem ser danificado, preservando sua estrutura e a do caule.

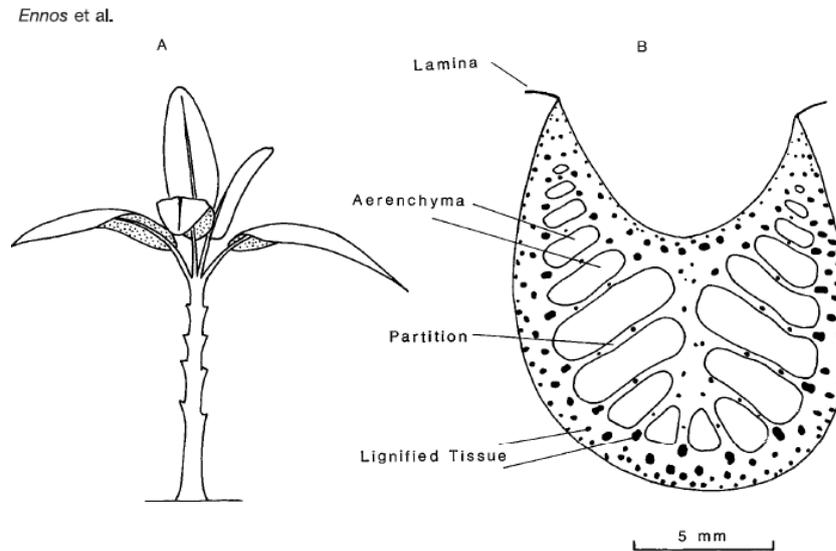


Figura 1.3. Diagrama da bananeira; (A) Vista geral da bananeira, observando que os pecíolos, que formam as regiões mais inferiores do pseudocaule se afastam no alto para suportar o peso das folhas. (B) Secção transversal do pseudocaule, mostrando seu formato em “U”, em uma estrutura aerada de eixos longitudinais.

Fonte: Ennos et al. (2000)

1.2 Componentes químicos da Bananeira

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

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

Jones (1965) solucionou a interferência de taninos presentes na banana na extração de proteínas do látex. Os taninos têm forte interação com cadeias peptídicas formando complexos insolúveis em água e precisam ser separados quimicamente para isolar as proteínas enzimáticas de interesse. Gelatinas, proteínas inertes e, também, a polivinilpirolidona fariam esse papel de precipitar complexos solúveis em água com baixo peso molecular de polifenóis (taninos), no entanto poderiam ter impedimento de oxidação posterior levando à desativação enzimática. O látex colhido foi de bananas verdes do cultivar “Valery”, fracionado em centrifugação de baixa velocidade. A partição aquosa (pH 4,5) foi submetida à diálise, cromatografia por papel, teste de precipitação de taninos e análise colorimétrica. Após diálise prolongada, trocando a água destilada muitas vezes, o tanino permaneceu insolúvel em água. O polietileno glicol reagiu espontaneamente com o tanino do látex da banana, diferente de outros solventes orgânicos e água fervente nos quais era insolúvel. A cromatografia evidenciou que depois de o tanino ser tratado com o PEG o mesmo não se apresentava mais presente na partição. A estequiometria da reação entre o PEG-tanino ainda estava indeterminada, com provável ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia do PEG com grupamento hidroxila fenólico (tanino). Dopamina, serotonina e um flavonol não identificado foram revelados também. O uso de PEG na extração enzimática de plantas que contêm taninos mostrou-se eficaz.

Yang et al. (2000) purificaram a enzima Polifenol oxidase de *Musa sapientum* L. O fato de existir dopamina na casca e polpa da banana e ela reagir fortemente com Polifenol oxidase, leva a crer que esta reação seria responsável pelo escurecimento da banana. O polissacarídeo da polpa da banana foi primeiramente hidrolisado por glucoamilase para não interferir nos procedimentos de purificação na troca iônica da cromatografia e na filtração. A molécula teve peso estimado de 41000. A enzima rapidamente oxidou a dopamina sendo o pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 30°C para esta reação. Sua atividade foi inibida por dietil-ditiocarbamato de sódio e cianeto de potássio, assim como pelo L-ácido ascórbico e cisteína. Entretanto, sob baixa capacidade tamponante, em pH 7, sua atividade também foi marcadamente inibida pelo ácido cítrico e ácido acético, podendo estes ser compostos capazes de evitar o escurecimento da banana.

Mondal et al. (2001) avaliaram a composição química do gel de *Musa paradisiaca* na Índia. O gel é produzido em resposta a lesões físicas ou ataque de patógenos. A bananeira,

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

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

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

Deshmukh et al. (2009) descreveram a importância de conhecer as diferentes composições químicas entre os cultivares de bananeiras na Índia para aprimorar seu valor de mercado e apresentar as vantagens de componentes químicos de uma sobre a outra. A presença de polifenol oxidase pode elucidar maior tempo de prateleira do produto, além de outros compostos tais como flavonas, fenóis e minerais que são essenciais para a nutrição humana e podem caracterizar princípios bioativos para uso medicinal. A banana é um produto importante na alimentação mundial com 88 milhões de toneladas métricas por ano ocupando uma área de

cultivo de 10 milhões de hectares e a Índia possui a maior produção mundial. Além de ser vendida *in natura*, pode ser feita cerveja ou vinho a partir da banana, petiscos desidratados, farinha e suco; o pseudocaule pode ser usado para fazer sapé, tecidos, cordame e como cobertura do solo em técnicas agrícolas. São encontradas nas regiões tropicais e subtropicais aproximadamente 30 espécies do gênero *Musa* e, dependendo da região que são cultivadas, recebem denominações diversas apesar de serem muitas vezes da mesma espécie e do mesmo cultivar. A composição química pode esclarecer melhor a correta identificação de cada uma, independente da segregação e variação local. O crescimento de frutas tropicais sob luz solar intensa lhes proporciona algumas moléculas importantes para evitar a peroxidação, principalmente na casca e na polpa do fruto, entre elas algumas enzimas purificadoras antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, carotenoides) e hidrossolúveis (ascorbato, glutatona, flavonoide). Frutos de 11 cultivares foram coletados de pomares do Sudoeste de Maharashtra e de partes de Karnataka, na Índia, num estágio de amadurecimento ainda amarelo esverdeado. Uma parte das frutas foi descascada e liquidificada com água deionizada, depois centrifugada a 4500 g por 15 min (4°C). O sobrenadante foi colhido e usado para o ensaio de antioxidantes. A porção insolúvel foi extraída com acetona e novamente centrifugada e também usada no ensaio de antioxidantes. Outra parte das frutas foi liofilizada e pulverizada e as amostras armazenadas a -20°C até sua análise. As amostras de casca de banana, sem o ápice e o caule, foram imersas por 20s em água fervente para inativar a polifenol oxidase, em seguida picadas e liquidificadas com água destilada, depois centrifugadas a 8000 g, submetidas à diálise durante 12 horas e depois concentradas em evaporador para serem usadas no ensaio de antioxidante. Foi observado que os resultados dos valores nutricionais de cada cultivar dependiam da variação de solo e climática de suas regiões. Claramente notou-se diferença dos constituintes químicos entre os cultivares. A vitamina C tinha mais concentração em frutos mais compridos. Os carotenos, fonte de vitamina A, mostraram pouca quantidade neste estudo diferindo de outros estudos realizados. A atividade da polifenol oxidase mostrou-se menor no cultivar Jawari e maior em Grand Naine. O cultivar Cavendish apresentou excelente atividade antioxidativa, na análise das cascas do fruto, atribuída à presença de catecolaminas. Neste estudo a presença de ácidos fenólicos foi pequena. Na análise das concentrações dos minerais pôde ser observado que o aumento da concentração de um eleva a concentração de outros. Na análise multivariável foi verificado que Basrai e Cavendish são o mesmo cultivar. Jawari e Shrimanti se destacaram dentre os outros cultivares por serem de maior potencial nutricional.

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

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

levodopa. A análise quantitativa do extrato por calibração externa revelou concentrações de serotonina, triptofano e tirosina de 2,7 a 7,6 µg/mL com desvios-padrão menores que 3,5%. Para validação dos dados, os compostos também foram avaliados por eletroforese de microchip acoplada ao espectrômetro de massas onde foram obtidos os íons 177 m/z da serotonina; 154 m/z da dopamina; 180 m/z do salsolinol; 205 m/z do triptofano; 182 m/z da tirosina; 365 m/z da maltose. A metodologia mostrou-se eficiente para a análise de misturas complexas como os componentes naturais provenientes da banana.

1.3 Medicina tradicional sobre a Bananeira

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

Grover et al. (2002) revisaram o uso de 45 plantas medicinais indianas contra diabetes. *Musa sapientum* foi citada utilizando a administração 4 mL/Kg da decocção das flores em coelhos hiperglicêmicos com bons resultados diminuindo os picos e a área da curva de tolerância da glicose. Ainda foram citadas atividade antioxidante e hipolipidêmica da banana. Os autores ressaltam a importância de uso dos conhecimentos da medicina tradicional em países ainda em desenvolvimento como uma alternativa econômica viável, além de promover o advento de novos biomateriais com significativa atividade contra patógenos endêmicos.

Medeiros et al. (2004) realizaram levantamento de 36 espécies de plantas medicinais da reserva do Rio das Pedras, estado do Rio de Janeiro, um remanescente da Floresta Ombrófila Densa, utilizadas pelos sítiantes residentes no local e de ascendência dos meeiros que

trabalhavam nas plantações de banana da antiga fazenda “Goiabal”. Estas espécies puderam ser relacionadas a 28 usos medicinais, organizadas em 7 grupos. Havia 21 espécies de plantas herbáceas, 8 arbustivas, 5 arbóreas. Por meio de entrevistas estruturadas e semiestruturadas aplicadas a essa comunidade foi feito o levantamento dessas espécies ao redor das casas dos mesmos. A folha era a parte mais utilizada e a manipulação mais comum era o decocto, sendo na área as de maior utilização a erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a pitanga (*Eugenia uniflora* L.). A banana (*Musa sapientum* L.) estava entre as espécies mais citadas sendo utilizada a folha deste herbáceo *in natura* para cicatrização. Deste modo, os autores elucidaram as espécies utilizadas com fins medicinais em áreas ainda habitadas da Floresta Atlântica.

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

Neto et al. (2006) participaram do projeto CALÚ implementando atividades socioeducativas e culturais em Itamatatiua e Samucangaua, comunidades remanescentes quilombolas no Maranhão, visando o desenvolvimento sustentável das mesmas. Dessa maneira procurou-se atingir algumas metas, dentre elas: identificar a referência em saúde para as comunidades; verificar o conhecimento das comunidades sobre saúde integral e fatores que interferem na mesma, bem como a conduta adotada quando adoecem; coletar dados dos registros das famílias de Itamatatiua de posse das Agentes Comunitárias de Saúde; introduzir noções de higiene pessoal e dos alimentos e educação alimentar; conhecer da comunidade de Itamatatiua sobre o uso de plantas com fins terapêuticos, listando-as de acordo com a finalidade a que se destinam e fotografando-as; recuperar conhecimentos populares sobre a produção de medicamentos com plantas, esclarecendo sobre os riscos da automedicação e introduzindo noções de cuidados e preparo dos remédios caseiros bem como suas indicações e contraindicações com base em estudos científicos. Foram coletados dados de registro das agentes comunitárias somando 123 famílias no local, com 141 crianças, 80 adolescentes, 225 adultos, 52 idosos e 5 de faixa etária desconhecida. Das 120 casas 35% não possuem energia elétrica, 50% não fazem nenhum tratamento da água, não existe coleta de lixo. Dentre as 52

plantas medicinais listadas, a bananeira foi citada para dor de dente (cárie) utilizando o leite de banana para esse fim. Verificou-se que a maior parte dos problemas de saúde da população decorre da falta de saneamento básico, infraestrutura domiciliar e ambiental e informações acerca da boa higiene e de prevenção de doenças.

Albuquerque et al. (2007) fizeram o levantamento de 21 trabalhos científicos publicados de pesquisas etnobotânicas sobre plantas medicinais da Caatinga, abrangendo os estados brasileiros de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco e Sergipe no período de 1985 e 2006. Coletaram desses artigos os nomes científicos, nomes populares, partes utilizadas da planta quando citadas, indicação terapêutica. Dessa maneira caracterizaram um índice de importância relativa dependendo do número de vezes que a espécie foi levada em conta por esses trabalhos. Houve um levantamento de 389 espécies de planta, dentre as quais apenas 48 tiveram um índice de importância maior do que 1,0, sendo que apenas 9 dessas espécies eram endêmicas da Caatinga. A bananeira também foi citada como planta medicinal utilizada para tosse, bronquite, asma, gripe, inflamações em geral, diarreia e antiofídica e relataram o uso da raiz e das folhas para tais fins, com índice de importância com valor de 0,7. A análise dos autores verificou grande número de espécies de plantas medicinais conhecidas da Caatinga, região Nordeste do Brasil, com necessidade de futuros experimentos fitoquímicos e farmacológicos e também de uma visão mais detalhada de sua disponibilidade para uso da população em geral.

Giorgetti et al. (2007) fizeram um levantamento histórico de registros literários no Brasil que apontassem plantas medicinais aplicadas para doenças do sistema nervoso central consultando fontes desde o século XVI. Levando em consideração a ampla biodiversidade presente na Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal, como também a agregação de conhecimentos multiculturais provenientes da colonização por povos da África, Ásia, Europa com os povos nativos, o conhecimento etnobotânico se enriqueceu muito. Foi feita uma triagem de livros que apresentassem tratamentos com plantas medicinais para doenças do sistema nervoso central nas bibliotecas da Universidade de São Paulo, Museu Padre Anchieta, Instituto Botânico de São Paulo e coleções privadas de dois pesquisadores com mais de 40 anos de experiência no uso de plantas medicinais, sendo que 6 livros foram selecionados. A partir daí foram consultados pelos nomes científicos os sítios eletrônicos da “Pubmed”, os Anais de 1968 a 2004 do Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais e a base de dados fitoquímica e etnobotânica “Dr Duke”. Além disso, foi verificado no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária o registro das plantas medicinais, bem como a presença de patente nos órgãos regulatórios brasileiro,

americano e europeu. Para *Musa sapientum* L. houve 1 relato na literatura histórica do uso do fruto como inebriante e intoxicante em 1939; ainda foram encontrados 7 estudos fitoquímicos evidenciando a presença de óleos essenciais, flavonoides, triterpeno cicloartanos, taninos e esteroides; 3 estudos farmacológicos mostrando efeito antioxidante e para sanar paralisia muscular; 1 patente com uso farmacológico antidepressivo.

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

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

1.4 Aplicações potenciais de Bioprodutos da Bananeira

Vega et al. (1988) procuraram determinar uma maneira de reutilizar resíduos de banana por fermentação de leveduras. Obtiveram fruto maduro da banana e prepararam um suco: primeiramente lavaram, fatiaram e colocaram no vapor para branqueamento; removeram a casca, moeram a polpa, deixando esfriar à temperatura ambiente, ajustou-se o pH para 4,0 com 3 N HCl, incubando com 0,05% de pectinase proveniente de *Aspergillus niger* por 2 h sob

agitação em banho-maria a 25°C; o suco foi separado do resíduo em centrífuga 27000 X g por 20 min a 4°C; por fim foi filtrado em papel filtro nº 40 Whatman e armazenado a -29 °C. Para sua utilização ele era diluído a 20% em água destilada e acertado o pH para 5,2, para depois ser esterilizado em autoclave. O suco extraído era claro e amarelado e com aproveitamento de 82% depois de incubado com a pectinase, com viscosidade absoluta de 3,72 P. Depois de esterilizado se tornava mais escuro e embaçado com formação de precipitado, sendo possível a formação ou degradação de componentes depois do aquecimento. Apresentava 24,4% de açúcares totais, 5,2% de glucose, 3,9% de frutose e 15,3% de sucrose, sendo que houve um aumento de 15% de açúcares totais depois da esterilização. O suco também continha 0,62% de lipídios, 0,77% de cinza e 0,087% de nitrogênio. O amido não foi detectado no suco, mas apenas na polpa por meio da adição de iodo, uma das duas metodologias empregadas para tal fim. Para conseguir sucesso na fermentação era necessário adicionar mais nutrientes, sempre respeitando a concentração de 20% do suco. Nessas condições foi possível produzir índices elevados de biomassa, mas a produção de lipídios não foi possível necessitando outros estudos para aprimorar a técnica.

Sharma et al. (1989) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do rizoma de *Musa paradisiaca* H. Kela. Relataram que seu fruto é consumido em larga escala pela população da Índia e que existe uso do rizoma para fins anti-helmínticos e anticoncepcionais. Os rizomas, depois de processo de secagem, foram submetidos sequencialmente à extração com hexano, benzeno e etanol para depois serem concentrados no rotaevaporador. A atividade antimicrobiana foi feita pelo teste de difusão em ágar com discos de filtro de papel, utilizando os meios de cultura em caldo Sabouraud e caldo Oxoid, para atividade antifúngica e antibacteriana. O crescimento das culturas de bactérias foi durante 18h a 37°C e para os fungos 72h a 26 °C. Todos os testes foram feitos em triplicata e medidos os halos dos diâmetros de inibição. Os controles positivos foram penicilina para bactérias e hamycin para fungos. Os micro-organismos testados foram: *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Streptococcus β-haemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. pyocyance*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*. O extrato benzênico teve a maior atividade antimicrobiana, exceto para *P. pyocyance*. O extrato hexânico teve boa atividade contra bactérias Gram-negativas em comparação às Gram-positivas e aos fungos. O extrato etanólico apresentou boa atividade apenas contra *Streptococcus β-haemolyticus* e *Klebsiella aerogenes* e nenhuma atividade foi observada contra os outros micro-organismos. Conclui-se que os diversos extratos possuem

princípios ativos diferentes com efeito antimicrobiano a diferentes micro-organismos, devendo ser identificados quimicamente.

Orie (1997) verificou que o extrato aquoso de *Musa paradisiaca* teve efeito vasodilatador na aorta e veias de ratos. O extrato foi feito de frutas maduras foram descascadas e marteladas para solubilizar em água. A solução aquosa foi centrifugada e filtrada em papel Whatman. O filtrado foi evaporado e o resíduo foi utilizado para preparar o extrato em uma concentração de 10^{-6} para 1 mg/mL. Depois de sacrificados os ratos foram obtidos anéis da aorta e de veias para observar sua reação ao extrato, mantido o tecido oxigenado em solução normal salina. Em um sistema reproduzindo estímulos adrenérgicos foi avaliada a influência do extrato sob os tecidos dos vasos. Os resultados indicam que houve relaxamento inespecífico da musculatura e inibição do tônus muscular dos vasos sanguíneos avaliados, lembrando que esse efeito não pode ser atribuído à alta concentração de serotonina presente no extrato, já que esta, quando testada isoladamente, produziu contração muscular, no entanto não se exclui a possibilidade de haver a interação *in vivo* da mesma, quando proveniente do extrato.

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

Pari e Uma-Maheswari (1999) baseados em prática regional de uso do suco de flores de bananeira para tratar diabetes na Índia avaliaram a glicemia de ratos após administração de concentrações de extrato de flores de *Musa sapientum* L. Depois de coletadas 500g de flores usando para a extração 1,5 L de clorofórmio pelo método da extração quente continuada, foram

obtidos 16,5 g de extrato, sendo este dissolvido em água estéril para ser usado no estudo. Os ratos foram induzidos a diabetes em duas semanas com glicemia de 200-260mg/100mL. Os 36 ratos foram divididos em 6 grupos, sendo um controle com ratos sem diabetes, o segundo com ratos diabéticos, diabéticos tratados com glibenclamida e o restante diabéticos tratados com o extrato em concentrações de 0,15, 0,20 e 0,25 g/Kg durante 30 dias. O extrato mostrou ser mais efetivo para reduzir a glicemia de ratos com diabetes induzida do que a glibenclamida, resultando em reduções significativas da glicose sanguínea, hemoglobulina glicosilada e o aumento do número de hemoglobulinas, especialmente em referência a concentração de 0,25 g/Kg.

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

Borges (2005) avaliaram em ensaios *in vitro* e *in vivo* o efeito inibitório da seiva de *Musa paradisiaca* L. contra o veneno de cobra. A coleta foi feita diretamente do pseudocaule da bananeira por meio de punção, centrifugado por 5 min a 3000 X g e o sobrenadante filtrado em papel Whatman, liofilizado e estocado a -20°C. O veneno de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi* e *Crotalus durissus terrificus* liofilizado foi dissolvido em soro fisiológico e centrifugado por 5 min a 3000 X g, em seguida os sobrenadantes foram imediatamente colhidos e utilizados no estudo. O extrato de *Musa paradisiaca*, quando misturado ao veneno de *crotalidae*, inativou sua proteína, demonstrou efeito anti-hemorrágico e anulou seu efeito

letal *in vitro*. Quando administrados separadamente em vias diferentes *in vivo* em ratos não surtiu efeito. A presença de polifenóis e taninos no extrato pode ser responsável pela desnaturação de proteínas presentes no veneno. O perfil da eletroforese tanto do plasma sanguíneo quanto do veneno foi alterado quando adicionado o extrato da seiva de bananeira. Os compostos formados poderiam ter dimensões moleculares que não permitiram entrar no gel. Os componentes do extrato reagem com proteínas plasmáticas e por isso não houve sucesso quando utilizado *in vivo*, pois não poderiam reagir com as proteínas do veneno presentes no organismo do roedor.

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

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

biossorvente de Cr(VI) é 4 vezes mais eficaz do que redutores químicos e apresenta-se como uma solução ecológica e economicamente viável.

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

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

Bankar et al. (2010) propuseram o uso de resíduo de casca de *Musa paradisiaca* para sintetizar nanopartículas de ouro, que podem ser utilizadas em catálise, óptica, óptica eletrônica,

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

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

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

Amutha e Selvakumari (2014) estudaram o extrato metanólico do caule de *Musa paradisiaca* Linn com análise fitoquímica que apresentou grande quantidade de glicosídeos e taninos, quantidade moderada de alcaloides, saponinas, flavonoides e fenóis. O extrato possui propriedade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, sendo a concentração inibitória mínima de 0,5mg/mL e 1mg/mL, respectivamente. Feridas de queimaduras foram realizadas com filamento metálicos incandescentes na extensão de 8 mm nos membros posteriores de ratos Wistar, sob anestesia com éter. O grupo controle foi tratado com vaselina e o outro com o extrato, sendo aplicados uma vez por dia durante quinze dias. Após esse período a ferida e o tecido circunvizinho era removida cirurgicamente para análise histopatológica. A regeneração tecidual foi acelerada no grupo tratado com extrato metanólico de *Musa paradisiaca* Linn em comparação ao controle, provavelmente devido aos seus princípios bioativos, o que corrobora com as indicações etnobotânicas da medicina tradicional.

Mathew e Negi (2017) encontraram em revisão de literatura indicação sobre a aplicação farmacológica de substâncias fitoquímicas provenientes de diversas partes de *Musa acuminata*. Estudos farmacológicos respaldam o seu uso da medicina tradicional para fins terapêuticos para diferentes patologias, inclusive de origem infecciosa, citando ensaios em modelos animais com resultados favoráveis para essas indicações de uso clínico. Portanto, *M. acuminata* possui potencial para bioprodutos inovadores com propriedades farmacológicas e curativas indicadas

pelo conhecimento popular, que pode ser usado para o desenvolvimento de agentes terapêuticos de alta eficácia. Sendo assim, apresentamos aqui um estudo que pretende fazer uso do extrato glicólico do fruto da bananeira, *Musa paradisiaca*, como veículo de pastas endodônticas no tratamento das patologias periapicais de dentes decíduos e permanentes.

2. PASTAS ENDODÔNTICAS PARA DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES

O uso de pastas endodônticas é parte da rotina clínica de protocolos terapêuticos na Endodontia de dentes decíduos para preenchimento dos canais radiculares e de dentes permanentes como medicação intracanal. A medicação intracanal aqui é apresentada simbolicamente na tentativa de buscar sua evolução cronológica de forma a permitir uma fonte de consulta para os trabalhos científicos que foram considerados importantes para o desenvolvimento conceitual desse estudo.

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

Nelson Filho et al. (1999) avaliaram a resposta inflamatória induzida por pastas endodônticas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associadas ou não a paramonoclofenol (PMC) e /ou cânfora em diferentes períodos no subcutâneo de ratos. Os autores postularam ser digno de nota o menor dano causado por pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ contendo o Polietilenoglicol 400 (PEG) como veículo, já que após a ionização as hidroxilas não se mantêm livres por um longo período de tempo, pois logo se combinam com H^+ liberado da ionização de PEG na água. Houveram variações das respostas teciduais, normalmente relacionadas com os componentes adicionados às pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, de forma que foi verificado que a adição de cânfora ao PMC promoveu uma menor agressividade ao tecido. Todas as pastas no final do período avaliado provocaram o reparo tecidual, contudo os autores concluíram que a pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com PEG foi a de melhor biocompatibilidade.

Estrela et al. (2001) imergiram 588 cones de papel absorvente em inóculos de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, durante 3 minutos, e depois os colocaram em placas de Petri a fim de avaliar a atividade antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio. As placas foram preenchidas com as pastas: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + soro; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + paramonoclorofenol canforado; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + clorexidina 1%; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + lauril sulfato de sódio 3%; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Otosporin[®]. Nos intervalos de 1 min, 48 h, 72 h e 7 dias os cones foram removidos e imersos em meio Lethen Broth, incubando-os a 37°C por 48 h. O crescimento foi avaliado pela turbidez das soluções. Sob as condições deste estudo não houve diferença de tempo de ação antimicrobiana entre os diferentes veículos testados, pois todos obtiveram atividade após 48 h.

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

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

metabólica, o que torna o espectro de ação do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bastante amplo. O tratamento realizado em duas consultas, com o uso de medicação à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, promove melhores resultados no processo de cicatrização periapical do que o tratamento em sessão única.

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

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

Revisando sistematicamente a literatura, Lin et al. (2007) encontraram poucos estudos randomizados e controles clínicos longitudinais comparando tratamentos endodônticos realizados em sessão única em relação à terapia em múltiplas sessões com a utilização de medicações intracanal. Em casos de persistência de exsudato e sintomatologia estaria melhor indicada a terapia com múltiplas sessões para existir a possibilidade de ação dos medicamentos intracanal eleitos. Os autores ressaltam a indicação para tratamento em sessão única para periodontite apical assintomática, justificando o uso de avanços tecnológicos disponíveis atualmente, como instrumentos rotatórios e de níquel-titânio. O preparo do terço apical radicular deve ser conduzido de forma a alargá-lo para aprimorar a ação dos irrigantes endodônticos e na erradicação de bactérias.

Murad et al. (2008) avaliaram a invasão bacteriana pela coroa dentária, observando que existe inibição químico-mecânica causada por pastas à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Foram testadas

associações com Polietileno glicol (PEG) e paramonoclorofenol canforado (PMCC); água destilada; Polietileno glicol; Glicerina. Respectivamente, as pastas que tiveram menor infiltração bacteriana foram citadas de maneira que houve diferença estatisticamente significativa entre as pastas compostas com PEG + PMCC e a que tinha glicerina, a primeira sendo mais eficaz.

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

Desai e Chandler (2009) fizeram um levantamento da literatura de estudos clínicos e laboratoriais de cimentos endodônticos à base de Ca(OH)_2 comprovando mais uma vez que sua atividade bactericida depende da disponibilidade de íons hidroxila. Seu pH altamente alcalino estimula o reparo e ativa a calcificação. Existe uma resposta degenerativa inicial em sua adjacência, seguida rapidamente por mineralização. O ambiente alcalino neutraliza o ácido láctico proveniente de osteoclastos e previne a reabsorção de estruturas dentárias e, também, ativa a enzima fosfatase alcalina que tem importante papel na deposição de tecido duro. Possui a capacidade de desnaturar proteínas de dentro do canal, tornando-as menos tóxicas. A ativação da reação cálcio-dependente da adenosina trifosfatase, associada à formação de tecido duro, é dada pelo hidróxido de cálcio. O fato de conseguir atravessar os túbulos dentinários e entrar em contato com o ligamento periodontal estimula o reparo e paralisa a reabsorção radicular.

Gomes et al. (2009) avaliaram a ação de medicação intracanal na superfície externa radicular. 312 raízes de caninos extraídos foram tratadas, esterilizadas, eliminando do estudo aquelas com a presença de qualquer fratura ocorrida pela manipulação e evidenciada em microscopia de varredura. As medicações foram inseridas no canal radicular e depois o mesmo foi selado. Os dentes foram dispostos sobre o ágar para que houvesse a difusão através dos túbulos dentinários para o meio de cultura específico para cada micro-organismo testado, por 2 h e, depois, incubados. Foi ainda observada a presença e a ausência de cemento radicular nos dentes, havendo grupos distribuídos uniformemente para ambos. A ação antimicrobiana, do mais forte ao mais fraco medicamento foi, respectivamente: clorexidina 2%, clorexidina 2% + Ca(OH)_2 , óxido de zinco + clorexidina 2% + Ca(OH)_2 , soro fisiológico + Ca(OH)_2 . Não houve

diferença entre a presença ou ausência de cimento radicular e os testes foram feitos contra as cepas de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*. A clorexidina mostrou ter boa difusão através dos túbulos dentinários sendo eficiente na atividade antimicrobiana sobre a superfície externa radicular.

Huang et al. (2009) verificaram diferentes efeitos biológicos em células de linhagem de osteossarcoma U2OS de pastas endodônticas para dentes decíduos empregadas na prática clínica. As pastas endodônticas avaliadas foram ZnO e eugenol, Ca(OH)₂ e formocresol (FC), Ca(OH)₂ e iodofórmio com água deionizada, Ca(OH)₂ e iodofórmio com paramonoclorofenol canforado (PMCC), Ca(OH)₂ e PMCC, Ca(OH)₂ e iodofórmio com óleo de silicone (Vitapex[®]). Seus componentes foram eluídos em meio de cultura para serem testados os diferentes tratamentos nas células U2OS, sendo o meio de cultura o controle. Foi avaliada a fragmentação de DNA para cada material. Ainda foram determinados os níveis de expressão de ciclooxigenase e a expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose reguladas por proteíno-quinases ativadas por mitógenos via uma cascata de sinais biomoleculares que podem ser desencadeados por estímulos extracelulares. A transcrição do fator nuclear KappaB é essencial nas respostas inflamatórias gerais e de imunidade do organismo, regulando a expressão de ciclooxigenase em diferentes linhagens celulares. Existe um potencial de proteíno-quinases ativadas por mitógenos estarem envolvidas na ativação do fator nuclear KappaB. Pode-se ressaltar que os materiais testados estimularam a proliferação e a diferenciação das células U2OS. Os resultados mostraram que nenhum dos materiais testados foram genotóxicos para as células U2OS cultivadas. Em contrapartida todos os grupos, com exceção da pasta de ZnO e eugenol com FC, induziram p53 e a expressão de ciclooxigenase. Esse fato pode indicar o mecanismo citotóxico seguido pela exposição das células aos materiais testados induzindo a apoptose.

Queiroz et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de pastas para preenchimento de canal em tratamento endodôntico de decíduos. Foi feito o teste contra as cepas de *Kocuria rhizophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* usando a técnica de difusão em ágar pelo método do poço. As pastas que tiveram maior eficácia foram, respectivamente: cimento de óxido de zinco e eugenol, Calen[®] (Polietileno glicol + Ca(OH)₂) espessado com óxido de zinco, Sealapex[®] (Ca(OH)₂) e EndoREZ[®]. Foram utilizados como controle a pasta Calen[®], clorexidina (1%) e água destilada. Ressalta-se que Calen[®] + ZnO teve a maior atividade antibacteriana contra *E. faecalis* (seu halo foi maior que

aquele obtido pela clorexidina 1%), tendo a mesma eficiência que o cimento de óxido de zinco e eugenol contra *S. aureus*.

Athanassiadis et al. (2010) investigaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de medicações intracanal contra *E. faecalis*, dentre elas, pasta Pulpdent[®], pasta Ledermix[®], mistura 1:1 de ambas anteriores, réplica de Ledermix[®] manipulando-se PEG 400 / 3350, água, 3.2% dimeclociclina HCl, óxido de zinco, cloreto de cálcio, trietanolamina, sulfito de sódio e Germaben IIE, excluindo apenas o corticosteróide (triamcinolona); as réplicas das bases dos veículos das pastas também foram testadas, água e metilcelulose no caso de Pulpdent[®], água e PEG 400/3350 para Ledermix[®]. Foram colhidas de uma placa de ágar de sangue de cavalo (HBA) 4 a 5 colônia de *E. faecalis* e cultivadas em 10 mL de caldo de cérebro/coração (BHI), incubadas a 35°C por 24h. O inóculo foi padronizado a escala 0,5 de McFarland. 3 discos de filtro de membrana de nitrocelulose de 0,2 µm estéreis foram dispostos sobre uma placa de HBA, com a intenção de averiguar a atividade antimicrobiana após 1, 3 e 5 dias, além de outros 4 discos adicionais para servirem de controle, os quais foram colhidos conforme os filtros teste iam sendo colhidos. Essa metodologia mantinha a viabilidade do biofilme provendo nutrientes de sua base de ágar inferior, já que o mesmo tem vida útil de 7 dias antes que comece a ressecar e perca suas propriedades. Uma suspensão de 20 µL do caldo foi colocado no centro de cada disco de filtro, depois que o inóculo foi absorvido pelo meio, as placas de HBA foram incubadas por 48h a 35°C. Sobre 3 lamínulas de vidro estéreis de 22mm foi disposto 0,1g da amostra, para depois serem invertidas sobre os discos de filtro incubados com o biofilme de maneira a permitir que houvesse contato direto entre a pasta e todo o biofilme, sem ultrapassar as bordas dos discos, eliminando a chance de haver bolhas de ar entre ambos, incubando-se, por fim, as placas por 5 dias a 35°C. Foram dispostas lamínulas da mesma maneira sobre os filtros incubados com biofilme sem nenhuma medicação, como controle e eram removidos juntamente com os discos testes na mesma oportunidade para servirem de referência para contagem de UFC e possibilitar a determinação do índice de sobrevivência bacteriana (ISB). Nos tempos de 1, 3 e 5 dias foram removidos os respectivos discos teste e controle com suas lamínulas, colocando cada conjunto em um tubo com 10 mL de água destilada estéril para então serem levadas ao vórtex por 1 min. Foi feita uma diluição seriada a 10⁻⁶ em 2 mL de caldo de tripton de soja, com alíquotas de 200 µL. Cada solução obtida, inclusive aquela que não foi diluída, foi plaqueada em ágar HBA com 100 µL e incubadas por 24h a 35°C. As colônias foram contadas para cada placa e a UFC determinada multiplicando esse número pela diluição (10⁻¹ até 10⁻⁶) e por 100. O IBS foi obtido dividindo a UFC (teste) pela UFC (controle) multiplicada por 100, sobre esse valor calculou-se

o log na base 10. Como comparação, se o log na base 10 fosse feito usando apenas os dados do controle, esse seria sempre igual a 2. Cada experimento foi repetido 6 vezes. Pulpdent[®] produziu a maior redução do ISB, seguida pela mistura 1:1 de Pulpdent[®] e Ledermix[®]. Ledermix[®], sua réplica e os veículos individuais não mostraram redução significativa no ISB para *E. faecalis*. As preparações com hidróxido de cálcio tiveram maior potencial inibitório para reduzir a sobrevivência de *E. faecalis* em uma reprodução laboratorial de seu biofilme.

Jhamb et al. (2010) compararam o efeito antibacteriano do Ca(OH)₂ e da CHX contra *E. faecalis*. Existem micro-organismos que resistem após o preparo biomecânico dos canais radiculares, mesmo sendo realizado conforme os protocolos terapêuticos, dentre eles o de maior prevalência é o *E. faecalis*. As substâncias avaliadas foram CHX 0,2%, CHX 0,12%, Ca(OH)₂ com água destilada, Metapaste[®] com água destilada, Ca(OH)₂ com CHX 0,2%, Ca(OH)₂ com CHX 0,12%, Metapaste[®] com CHX 0,2%, Metapaste[®] com CHX 0,12%, ampicilina como controle positivo, utilizando-se o método de difusão em ágar. *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva sem mobilidade, podendo ser observada sozinha, aos pares ou em cadeias curtas; anaeróbia facultativa, fermenta glicose sem a produção de gás e não produz uma reação de catalase com peróxido de hidrogênio, podendo produzir uma reação de pseudocatalase quando cresce em ágar sangue (normalmente fraca), apresenta reação gamma para hemólise, produz uma redução do leite de tornassol, mas não liquefaz gelatina. São suscetíveis à vancomicina, enquanto que gentamicina e estreptomina apresentam sinergia com efeito bactericida. A cepa foi inoculada em caldo de tripticase de soja por 12 h a 36.5°C. Após obtenção do inóculo ele foi semeado em placas de ágar de tripticase de soja e, depois de colocados os cones de filtro de papel estéril encharcados com as substâncias a serem testadas, foram incubadas por 72 h a 36.5°C. Os halos de inibição obtidos pela CHX mostraram-se significativamente maiores que os de Ca(OH)₂ provando ser um agente antibacteriano mais eficaz contra *E. Faecalis*.

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

sucesso completo quanto ao reparo de tecido duro, enquanto que 16 dentes tiveram um reparo parcial no período estudado. A pasta com Hidróxido de Cálcio + Óxido de zinco e eugenol + iodofórmio teve sua reabsorção acompanhando a rizólise do dente decíduo. Vale ressaltar que com o uso da última pasta houve um reparo completo das lesões de 17 dentes (54,8%).

Sarigol et al. (2010) avaliaram em células L929 de murinos a citotoxicidade *in vitro* de 5 pastas endodônticas: Kri1 (iodofórmio); Diapex[®] (iodofórmio+Ca(OH)₂), Metapaste[®] (Ca(OH)₂+água destilada), Dentalis[®] (iodofórmio+ZOE+Ca(OH)₂) and Kalsin[®] (Ca(OH)₂+glicerina) por meio do ensaio de tetrazólio (MTT) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. A biocompatibilidade de um material é definida pela sua aplicabilidade na presença de uma resposta apropriada do organismo. Todos os materiais testados foram citotóxicos, sendo que sua citotoxicidade aumentou conforme fosse maior o intervalo avaliado. Pastas endodônticas compostas por agentes antimicrobianos potentes, provavelmente vão obter alta citotoxicidade. A comparação entre diferentes ensaios de cultura celular é um desafio, pois existem muitas variações das condições experimentais, como o tipo de célula, o método de contato dos tratamentos com as células e o intervalo de exposição.

Badr et al. (2011) compararam o Ca(OH)₂ com uma medicação endodôntica a base de alcaçuz, avaliando sua citotoxicidade e efeito antibacteriano contra *E. faecalis*. Para determinar a citotoxicidade foram utilizadas culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano. O alcaçuz combinado ou não ao Ca(OH)₂, teve sua atividade antibacteriana avaliada pelo método da difusão em ágar por poços, teste de microdiluição e ensaios de suscetibilidade do biofilme. Alcaçuz teve sozinho ou combinado ao Ca(OH)₂ maior efeito bactericida contra *E. faecalis* do que Ca(OH)₂ sozinho. O uso de alcaçuz teve maior biocompatibilidade do que Ca(OH)₂, que teve forte efeito letal às células. O extrato de alcaçuz ou sua combinação com Ca(OH)₂ tem maior efeito bactericida e possui mais biocompatibilidade em comparação com a medicação de Ca(OH)₂ normalmente usada na Endodontia.

Kayaoglu et al. (2011) testaram a atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* de 2 amostras de própolis comparadas a agentes irrigantes endodônticos. Blocos de dentina padronizados foram contaminados com *E. faecalis*. O espaço do canal radicular foi preenchido com um dos extratos etanólicos de própolis, CHX 2%, Ca(OH)₂, etanol ou solução salina de tampão fosfato como controle. A amostra da dentina radicular foi obtida após 1 ou 7 dias usando uma broca de tamanho padrão. O aglomerado de raspas dentinárias foi centrifugado vigorosamente em solução tampão de fosfato e alíquotas foram cultivadas em placas de ágar tripton de soja. As colônias foram contadas após dois dias de incubação. Todos os agentes

reduziram significativamente o número de bactérias cultiváveis. A clorexidina foi o agente antimicrobiano mais potente em ambas as vezes. Comparado com o controle de etanol, não houve redução significativa no número de colônias para os extratos de própolis após um dia, no entanto, o resultado foi significativo após sete dias. As duas amostras de própolis foram estatisticamente semelhantes entre si e Ca(OH)_2 , mas uma das amostras também foi semelhante à clorexidina após 7 dias. Isso pode ser associado a uma maior concentração de flavonoides, um grupo de compostos ativos antibacteriano, nesta amostra específica, encontrados pela análise realizada por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas. A atividade antimicrobiana das amostras de própolis testadas neste estudo estava entre o Ca(OH)_2 e a CHX. Ambas as amostras de própolis foram eficazes antimicrobianos, porém, a sua atividade não excedeu a da CHX.

Queiroz et al. (2011) avaliaram pastas endodônticas em subcutâneo de rato colocadas em implantes de tubos de polietileno por um período de 7, 21 e 63 dias. As pastas avaliadas eram de ZnO e eugenol, Ca(OH)_2 + PEG (Calen[®]) espessada com ZnO e um cimento endodôntico de Ca(OH)_2 (Sealapex[®]). Os autores observaram as reações teciduais histologicamente e a área com espessamento e o infiltrado inflamatório do tecido reacional produzido pela pasta Ca(OH)_2 +ZnO diminuiu com o tempo e apresentando formação de colágeno na interface entre o tecido e o implante do material testado. Esta pasta apresentou melhor resultado ($p < 0.05$), seguida do cimento endodôntico de Ca(OH)_2 (Sealapex[®]) e da pasta ZnO e eugenol.

Silva et al. (2013) é um artigo de nosso grupo em que foi publicada a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Musa paradisíaca* (Mp) sobre *Enterococcus faecalis*. Para realizar o experimento, o extrato glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB) substituiu o Polietilenoglicol 400 (PEG), que é um veículo que compõe algumas medicações intracanal. Foi utilizado o teste de difusão em Ágar, pelo método do poço, para a avaliação da atividade antimicrobiana contra a cepa de *Enterococcus faecalis* normalmente relacionada a infecções refratárias endodônticas. Experimento “A”: G1, PEG (controle negativo); G2, PEG e Ca(OH)_2 ; G3, EGB; G4, EGB e Ca(OH)_2 ; G5, gel de Clorexidina 2% (CHX – controle positivo). Experimento “B”: G1, PEG (controle negativo); G2, PEG e ZnO; G3, PEG, Ca(OH)_2 e ZnO; G4, EGB e ZnO; G5, EGB, Ca(OH)_2 e ZnO; G6, CHX (controle positivo). Apenas a pasta de EGB e ZnO obteve atividade antimicrobiana estatisticamente significativa, podendo ser uma propriedade importante para a composição de medicação intracanal.

Pires et al. (2016) estudaram a resposta do estresse oxidativo, citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de quatro pastas iodoformadas e três pastas de Ca(OH)_2 em leucócitos e DNA purificado de timo de bezerro, nos intervalos de 24 e 72 horas. O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade. Ainda foram avaliados a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a peroxidação de lipídeos. A genotoxicidade foi verificada pelo ensaio alcalino do cometa e checada pelo ensaio de capacidade de modificação genética. Os extratos das pastas de Ca(OH)_2 provocaram um aumento significativo da viabilidade celular em relação ao grupo controle. Ao passo que todas as pastas de Ca(OH)_2 causaram formação de ERO em 24 horas e, em 72 horas, não causaram estresse oxidativo às estruturas lipídicas celulares. Todas as pastas de hidróxido de cálcio induziram dano ao DNA. Os autores ressaltam que a contradição entre os resultados obtidos com a literatura tem relação com as diferenças dos procedimentos experimentais, tais como concentrações dos extratos e métodos de cultura celular.

Pilownic et al. (2017) avaliaram a atividade antibiofilme de cinco pastas para preenchimento de canais radiculares de dentes decíduos: cimento de ZnO e eugenol, pasta iodoformada de Ca(OH)_2 (Vitapex[®]), pasta de Ca(OH)_2 com Polietileno Glicol (Calen[®]) espessada com ZnO, pasta aquosa de Ca(OH)_2 e pasta aquosa de iodofórmio. Trinta e seis discos de hidroxiapatita serviram de substrato para o crescimento do biofilme durante 3 semanas e sua atividade antibiofilme foi avaliada em 7 e 30 dias. As bactérias foram pigmentadas com SYTO 9 e eram viáveis quando emitiam fluorescência verde e o pigmento iodeto de propídio identificava as mortas com fluorescência vermelha, sendo avaliadas pela microscopia confocal de varredura a laser. A pasta aquosa de Ca(OH)_2 e Calen[®] espessada com ZnO demonstraram resultados fracos contra o biofilme. O cimento de ZnO e eugenol apresentou atividade moderada antibiofilme. A pasta aquosa de iodofórmio e Vitapex[®] foram os materiais mais efetivos contra o biofilme. A resistência de micro-organismos em biofilmes é entre 100 a 1000 vezes maior do que no crescimento planctônico, um dos motivos seria que uma bactéria em biofilme expressa diferentes fenótipos de seu estado planctônico. Eliminar biofilme do sistema de canais radiculares é um desafio para as técnicas de instrumentação e irrigação da Endodontia, ressalta-se ainda a rizólise que amplia em bisel o forame apical e canais laterais, os canais acessórios na furca e a exposição dos túbulos dentinário e, também, a reabsorção patológica das raízes dos dentes decíduos. A resistência do biofilme apresentada no trabalho de Pilownic et al. (2017) aponta a necessidade de novas alternativas para o tratamento endodôntico, por essa razão

a bioprospecção de ativos encontrados em produtos naturais é justificada, pois podem ser responsáveis por novos produtos de uso na Endodontia de decíduos e permanentes.

Silva (2018) é uma publicação dos nossos resultados obtidos de estudos anteriores sobre o EGB. Um capítulo é referente ao estudo publicado de ação antimicrobiana (SILVA et al., 2013). Apenas a pasta de EGB e ZnO obteve atividade antimicrobiana estatisticamente significativa com resultados similares ao controle positivo e foi submetida à macrodiluição para que fosse verificada a concentração inibitória mínima, mas nenhuma diluição da pasta foi capaz de evitar o crescimento de *E. faecalis*. Esses dados foram tratados estatisticamente a 95% de significância usando o teste de Mann-Whitney e a Estatística Descritiva. A composição do EGB foi avaliada por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray e foi verificado que um dos componentes majoritários poderia ser a maltose. A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi realizada nas fases de acetato de etila, diclorometano e aquosa resultantes da partição líquido/líquido realizada no EGB, depois de seco em capela. A CCD sugeriu a presença de flavonoides, terpenos, taninos e esteroides no EGB. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear foi realizada com o propósito de supor a composição do EGB e foi observado grande número de picos de sinais na região referente aos glicosídeos, assim como picos referentes à estrutura molecular de terpenos e um sinal característico de esteroides. O EGB possui características físicas adequadas para o uso clínico como veículo de pastas endodônticas, perfil micromolecular com biomoléculas que são potencialmente ativas na imunomodulação das doenças inflamatórias dos tecidos periapicais, já que se é verificada seu uso em medicina tradicional pela Etnobotânica, podendo ser um componente para a bioprospecção um novo produto endodôntico de origem natural.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de banana (*Musa paradisiaca*) (EGB).

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Verificar a citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de tetrazólio (MTT) de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* e de seus componentes isolados: ZnO, Ca(OH)₂ e EGB.

3.2.2 Verificar a citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de resazurina de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* e de seus componentes isolados: ZnO, Ca(OH)₂ e EGB.

3.2.3 Verificar a genotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de micronúcleos de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* e de seus componentes isolados: ZnO, Ca(OH)₂ e EGB.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo prospectivo experimental tem como objetos de pesquisa novas pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca*. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas, protocolo número 031797/2016 - CAAE 55232216.2.0000.5016 (ANEXO A). Em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, a atividade de acesso ao Patrimônio Genético com natureza de pesquisa científica foi cadastrada sob nº A1BA9CA no SISGEN (ANEXO B). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Básica “Prof. Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Todas as etapas foram realizadas respeitando-se as normas de biossegurança laboratorial. O cuidado com o manejo das células foi essencial para o sucesso do experimento.

4.1 Pastas Endodônticas de Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca*

O extrato glicólico de *Musa paradisiaca* (banana) (EGB) foi gentilmente cedido pela empresa MAPRIC[®] (São Paulo, SP, Brasil). Segundo o certificado de análise do fabricante (ANEXO C), o EGB é proveniente do fruto da bananeira e possui aparência de um líquido límpido amarelo claro a castanho, com odor característico; densidade de 1003 g/cm³; pH de 5,37; contagem de aeróbios totais, bolores, leveduras e total de bactérias menor que 10 UFC/g; ausência de coliformes; solúvel em etanol, propilenoglicol, glicerina, sorbitol e água.

O EGB substituiu o veículo que compõe algumas pastas endodônticas usadas como medicação intracanal, por exemplo o polietilenoglicol 400 (PEG). Os demais componentes das pastas que foram avaliados neste experimento são os pós de óxido de zinco (Biodinâmica[®], Ibiporá, PR, Brasil) e de hidróxido de cálcio pró-análise (Biodinâmica[®]), analisados isoladamente e em conjunto. As pastas endodônticas foram manipuladas com espátula flexível #24 sobre placa de vidro, de acordo com o protocolo descrito em (SILVA, 2011), com a proporção de 1g de pó com 1 mL de EGB, sendo que para a pasta endodôntica EGB+ZnO+Ca(OH)₂, foi utilizado 500 mg de cada pó. A distribuição dos grupos experimentais foi realizada de acordo com o Quadro 4.1. Ressalta-se que não foi vista a necessidade de incluir um grupo controle com um veículo inerte, por exemplo o propilenoglicol ou o polietilenoglicol, já que o resultado esperado seria equivalente ao controle positivo que contém apenas o meio de cultura.

Quadro 4.1

Grupos Experimentais

1 – Extrato Glicólico de <i>Musa paradisiaca</i> – banana - (EGB)
2 – óxido de zinco (ZnO)
3 – hidróxido de cálcio (Ca(OH) ₂)
4 – pasta endodôntica EGB + ZnO
5 – pasta endodôntica EGB + Ca(OH) ₂
6 – pasta endodôntica EGB + ZnO + Ca(OH) ₂
7 – DMEM Meio de cultura com células (controle positivo)

4.2 Cultivo Celular

Células da linhagem celular FMM1 imortalizadas são fibroblastos de mucosa mastigatória humana previamente isolados e caracterizados e pertencem ao Biobanco de Células do Laboratório de Pesquisa Básica “Prof. Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Martins Marques. Estas células deveriam apresentar sinais visuais de normalidade ao microscópio de fase invertida (Nikon TMS DS-Fi1, Nikon, Melville, NY, EUA) e ausência de contaminação. Além disso, deveriam estar entre a 5^a e a 10^a passagem/subcultura para ser evitado o risco de diferenciação. Foram excluídas as células FMM1 contaminadas por microrganismos ou que apresentassem sinais de diferenciação durante o tempo experimental. As células não foram utilizadas se estivessem com passagem elevada (acima de 10 passagens/subculturas).

As células FMM1 estavam congeladas em tambor de nitrogênio líquido e o tubo criogênico foi gentilmente submerso em banho-maria a 37°C com movimentos circulares suaves para descongelamento imediato por menos de 1 minuto. Ainda com uma pequena porção de cristais de gelo, o conteúdo total de 1 mL do tubo criogênico foi prontamente colocado por meio de uma pipeta em um tubo Falcon com 4 mL de meio de cultura pré-aquecido de Eagle de alto teor de glucose modificado por Dulbecco (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) e 1% de solução de antibiótico (100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina) (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA), com o cuidado de ressuspender o conteúdo pelo menos dez vezes e de levar algumas vezes o meio de volta ao tubo criogênico para transportar o número máximo possível de células. A maior concentração de soro fetal bovino é importante nesta fase para diminuir a toxicidade dos materiais crioprotetores, no caso o dimetilsulfóxido (DMSO). Observado o *pellet* após a centrifugação das células por 5 minutos a 1000 RPM, então o sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 1 mL de meio (DMEM) (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) e 1% de solução de antibiótico (100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina) (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) e, depois de acrescentados mais 9 mL do mesmo meio, foram incubadas por 24 horas em garrafas de cultura de 75 cm² a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Decorrido esse período, as células foram observadas em microscopia óptica com microscópio de fase invertido para checar se houve adesão celular. Na

sequência foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) para remover as células mortas e novo meio aplicado.

As células viáveis foram cultivadas em meio DMEM, sendo este meio de cultura refeito sempre que necessário para ser utilizado nas demais etapas do experimento. As células foram mantidas numa incubadora a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A subcultura foi realizada antes de atingir a confluência das células, a cada 2 ou 3 dias dependendo do metabolismo celular, que pode ser averiguado pela mudança de cor do vermelho de fenol para alaranjado, que indica alteração de pH.

Para subcultura e padronização do número de células, inicialmente as garrafas de cultura eram observadas em microscopia óptica com microscópio de fase invertido, averiguando a adesão celular e se estão em fase exponencial. O meio foi aspirado e as células lavadas 3 vezes com PBS para ser acrescentada a tripsina, solução enzimática que possibilita a remoção das células da garrafa de cultura, por 5 minutos em atmosfera úmida, a 37°C e a 5% de CO₂. Após esse intervalo as células encontravam-se suspensas e a tripsina era inativada com DMEM (que já era suplementado com soro fetal bovino) para a coleta das células e centrifugação a 1000 RPM por 5 minutos. Ao ser observado o *pellet*, o meio era aspirado e as células eram suspendidas em novo meio DMEM. Uma alíquota de 10 µL era colocada na câmara de Neubauer e a contagem das células era realizada. A padronização foi feita conforme a média do número de células encontrado dos quatro quadrantes da câmara de Neubauer.

O cálculo da alíquota necessária de DMEM com células foi realizado sobre o volume total de DMEM a ser utilizado nos experimentos. O planejamento considerou o volume de meio de cultura com células suficiente para 60 poços de 200µL para o ensaio de tetrazólio, 56 poços de 200µL para o ensaio de resazurina, e 21 poços de 600µL para o ensaio de micronúcleos, com o mínimo de 35,8 mL acrescidos de 10%, chegando ao valor aproximado de 39,4 mL. A fim de ser obtido um padrão de 1×10^3 células por poço nas microplacas de 96 poços, ou no caso do ensaio de micronúcleos, um padrão de 3×10^3 células por poço nas microplacas de 6 poços, foram necessárias $1,97 \times 10^5$ células em 39,4 mL de DMEM. Após esses procedimentos de padronização do número de células, as placas eram incubadas por 24 horas em atmosfera úmida, a 37°C e a 5% de CO₂. Depois de 24 horas as células das placas eram visualizadas em microscopia óptica com microscópio de fase invertido para averiguar sua adesão e se permaneciam viáveis.

4.3 Condicionamento do Meio de Cultura Celular

Para o condicionamento do meio de cultura pelos respectivos grupos (Quadro 4.1: (1)EGB, (2)ZnO, (3)Ca(OH)₂, (4)EGB+ZnO, (5)EGB+ Ca(OH)₂, (6)EGB+ZnO+Ca(OH)₂) foi colocado 1 grama do componente de cada grupo, sendo 1 mL de EGB, no fundo de um tubo Falcon (#50 mL) e 5 mL do meio de cultura DMEM foram gentilmente dispensados sobre cada material, obedecendo a proporção de 0,2 grama do respectivo grupo experimental para cada 1 mL de meio de cultura DMEM (ISO, 2008) – com exceção do grupo controle (Figura 4.1A). Os materiais de cada grupo experimental eluíram por 24 horas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida de CO₂ a 5%. Após o período de 24 horas, os tubos com os meios condicionados pelo material de cada grupo experimental foram centrifugados a 1000 RPM durante 5 minutos e filtrados com seringas a 0,2 µm (KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) para a remoção de partículas sólidas (Figura 4.1B). Os meios de cultura condicionados foram diluídos em porcentagens de acordo com cada experimento realizado e utilizados frescos, ou seja, eram utilizados imediatamente em cada experimento, sem serem armazenados para uso posterior.

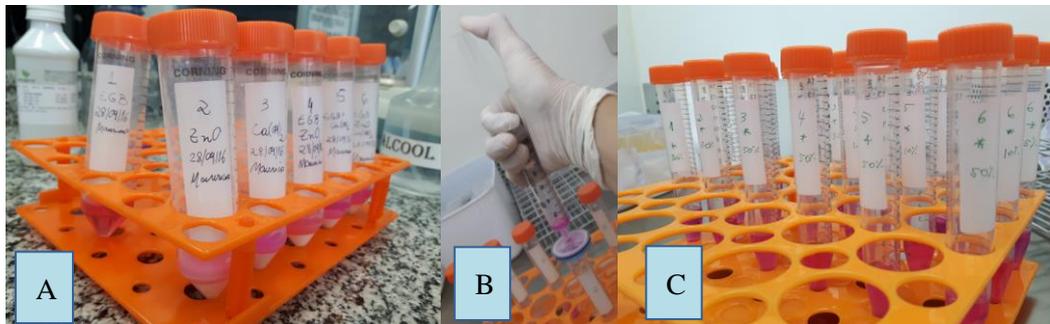


Figura 4.1 – Preparo do meio de cultura. A: Condicionamento do meio de cultura DMEM para cada grupo experimental. B: Filtragem com filtros de 0,2 µm para remoção de partículas sólidas. C: Diluições a 50%, 10% e 5% para cada grupo no ensaio de tetrazólio, nos ensaios de resazurina e de micronúcleos foi utilizada diluição a 10%.

4.4 Viabilidade Celular: ensaio de tetrazólio (MTT) em várias diluições

O ensaio de tetrazólio (MTT) foi realizado em triplicata. Decorridas 24h de incubação das células (1×10^3 por poço) distribuídas em duas placas de 96 poços e, após avaliação em microscopia óptica com microscópio de fase invertido se as células cultivadas estavam viáveis,

o meio de cultura foi aspirado e cada poço recebeu 100 μ L do meio de cultura condicionado com os elutos de cada grupo experimental em diferentes diluições: 50%, 10%, 5% (Figura 4.1C). Para obter as diluições os meios de cultura condicionados de cada grupo experimental receberam proporcionalmente quantidades de meio de cultura DMEM sem células, sendo que na diluição de 50% a proporção foi de 1 mL de DMEM condicionado para 1 mL de DMEM, na diluição de 10% a proporção foi de 0,2 mL de DMEM condicionado para 1,8 mL de DMEM e na a diluição de 5% a proporção foi de 0,1 mL de DMEM condicionado para 1,9 mL de DMEM, sendo o DMEM puro para o controle positivo (0%), que será colocado sobre as células que não receberão tratamento (Quadro 4.2). O volume de meio de cultura condicionado de 2 mL é suficiente para 20 poços de 200 μ L, prevendo que não faltará o meio condicionado, já que para o experimento em triplicata serão necessários 18 poços com 100 μ L para cada diluição. Para o parâmetro da absorbância do espectrofotômetro, a leitura do branco foi realizada para cada diluição em poços sem células.

Quadro 4.2

Diluição dos meios de cultura condicionados
Preparo dos meios de cultura condicionados antes de serem colocados sobre as células FMM1

DMEM condicionado por cada grupo experimental	DMEM	Volume Final	Porcentagem da concentração do meio condicionado diluído
1 mL	1 mL	2 mL	50%
0,2 mL	1,8 mL	2 mL	10%
0,1 mL	1,9 mL	2 mL	5%
-----	1 mL	1 mL	0% (para grupo controle)

Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂, as microplacas foram observadas em microscopia óptica com microscópio de fase invertido para averiguar se as células continuavam viáveis e depois os meios de cultura foram aspirados e lavados com PBS. As células então receberam uma alíquota de 90 μ L de DMEM e outra de 10 μ L do sal de brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (ThermoFisher® Scientific, Waltham, MA, EUA), de cor amarela. As células foram incubadas, ao abrigo da luz, a 37°C durante 3 horas em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Após esse período os poços foram aspirados. O MTT é reduzido em um formazan, de cor azul purpúrea, principalmente pelas enzimas oxidoreductase em consonância com a atividade de desidrogenase mitocondrial das células vivas. Os cristais de formazan resultantes do ensaio foram solubilizados por meio de

dimetilsulfóxido (DMSO) para então determinar a densidade óptica por meio do espectrofotômetro SynergyH1 (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 540 nm (CANDEIRO et al., 2016), permitindo verificar a viabilidade celular pelos dados de absorvância das diferentes diluições das amostras.

A viabilidade celular é indicada pela porcentagem de células vivas, que foi calculada multiplicando por 100 os valores obtidos das células tratadas e fazendo a divisão pelos valores do grupo controle sem tratamento. A viabilidade celular é satisfatória a partir de 70% (ISO 10993-5, 2009). Assim sendo, o cálculo segue a fórmula matemática abaixo (Quadro 4.3):

Quadro 4.3

Fórmula Matemática do Cálculo da Viabilidade Celular

$$\rightarrow \text{Porcentagem de células vivas} = \frac{\text{Valores de células tratadas} \times 100}{\text{Valores das células sem tratamento}}$$

4.5 Viabilidade Celular: ensaio de resazurina (AlamarBlue™)

O ensaio de resazurina (AlamarBlue™, Carlsbad, CA, EUA, Invitrogen) foi realizado com 8 réplicas de cada grupo. A viabilidade celular foi verificada com resazurina (AlamarBlue™), um reagente inócuo capaz de estabelecer a citotoxicidade relativa a diversos agentes externos como, por exemplo, as pastas endodônticas e seus componentes. As células viáveis reduzem continuamente a resazurina, que possui baixa fluorescência e é de coloração azul púrpura, para resofurina, que é de coloração rosa com alta fluorescência. Este ensaio foi também realizado nesta pesquisa por estar descrito na literatura como sendo mais sensível que o ensaio de tetrazólio (XU; MCCANNA; SIVAK, 2015). Foi estabelecida para este ensaio a diluição dos meios condicionados a 10%, já que essa diluição mimetiza melhor a situação clínica da aplicação das pastas endodônticas (CANDEIRO et al., 2016; CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005).

Decorridas 24h de incubação das células (1×10^3 por poço) distribuídas em duas placas de 96 poços e, após avaliação em microscopia óptica com microscópio de fase invertido (Nikon TMS DS-Fi1, Nikon, Melville, NY, EUA) se as células cultivadas estavam viáveis, o meio de cultura foi aspirado e cada poço recebeu 100 μ L do meio de cultura condicionado com os elutos de cada grupo experimental na diluição de 10%, sendo o DMEM puro para o controle positivo (0%), que será colocado sobre as células que não receberão tratamento (Figura 4.1C). Essa diluição de 10% foi obtida conforme descrito aqui anteriormente nos métodos do ensaio de tetrazólio (Quadro 4.2), sendo necessário um volume de 6 mL (0,6 mL de DMEM condicionado para 5,4 mL de DMEM) para 56 poços. Para o parâmetro da fluorescência do espectrofotômetro, a leitura do branco foi realizada para cada grupo em poços sem células.

Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂, as microplacas foram observadas em microscopia óptica com microscópio de fase invertido (Nikon TMS DS-Fi1, Nikon, Melville, NY, EUA) para averiguar se as células continuavam viáveis e foram adicionados 10 μ L de resazurina em cada poço (Figura 4.2) e incubadas ao abrigo da luz por um período de 4 horas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Decorrido esse intervalo de tempo, a leitura das microplacas foi realizada pelo espectrofotômetro SynergyH1 (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 550 nm para a excitação do reagente e com uma leitura de emissão de fluorescência de 585 nm.



Figura 4.2 – Métodos do ensaio de resazurina. A microplaca recebe a alíquota de 10 μ L de resazurina de cor azul purpúrea, após incubada por 24 horas com os tratamentos de cada grupo, sem haver a necessidade de lavar o meio de cultura condicionado pelos elutos de cada grupo. À direita: as microplacas são incubadas por 4 horas em seguida e devem ser protegidas da luz para não haver interferência da luminosidade do ambiente no reagente do ensaio.

4.6 Genotoxicidade: ensaio de micronúcleos (Vectashield® - DAPI)

Esse experimento foi realizado em triplicata. As células (3×10^3 por poço) foram semeadas em lamínulas de vidro dispostas em microplacas de 6 poços (Figura 4.3).

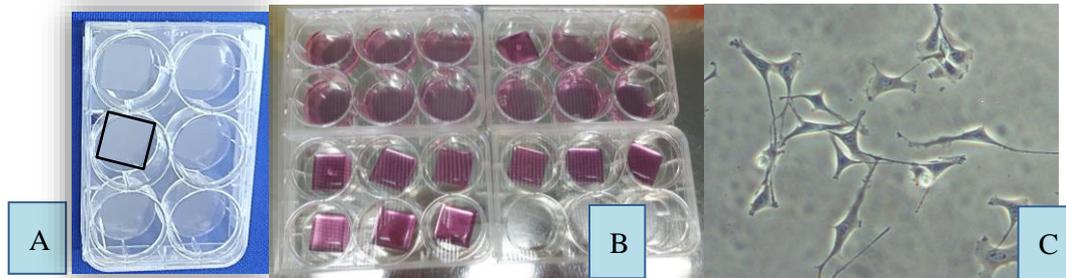


Figura 4.3 – Ensaio de genotoxicidade. A: lamínulas de vidro no fundo dos poços de 35 mm de diâmetro. B: meio de cultura DMEM sobre as lamínulas semeadas com 3×10^3 células. C: As células FMM1 devem ser visualizadas após os períodos de incubação e devem se apresentar viáveis antes de receberem o meio de montagem Vectashield® para o ensaio de micronúcleos.

As células foram incubadas durante 24 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelo meio condicionado diluído a 10% e incubou-se durante 24 h. Após este período, o meio condicionado foi descartado e as células eram lavadas duas vezes com PBS. As células foram então fixadas com solução a 4% de formaldeído à temperatura ambiente durante 20 min. A solução de formaldeído foi descartada e substituída por solução 100% de metanol fria (-20°C). As células foram deixadas à temperatura ambiente durante 20 min. A solução de metanol utilizada foi descartada, e as células foram lavadas três vezes com PBS. O meio de montagem das lâminas de microscopia foi o Vectashield® (Vector, Burlingame, CA, EUA), que contém 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) capaz de fluorescer quando ligado ao DNA e é usado para contrastar o núcleo ou os cromossomos. O Vectashield® foi colocado no topo das células e mantido durante 15 min à temperatura ambiente. As células eram em seguida, lavadas cinco vezes com PBS. As lamínulas de vidro com as células foram visualizadas e fotografadas no microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Foi feita a contagem de micronúcleos em 1000 células de cada grupo experimental, observadas em cinco campos microscópicos pré-determinados (nos quatro cantos e no centro da lamínula) com ampliação de 400 vezes (CANDEIRO et al., 2016).

4.7 Análise Estatística

Os dados da viabilidade celular dos grupos experimentais foram comparados utilizando análise de variância ANOVA e teste de Tukey, o nível de significância adotado foi de 95% ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas com *software* XLSTAT[®] (Addinsoft, Nova York, NY, EUA) para EXCEL[®] (Microsoft, Nova York, NY, EUA). Os dados de genotoxicidade foram avaliados por meio da estatística descritiva.

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular: ensaio de tetrazólio (MTT) em várias diluições

Neste experimento com tetrazólio (MTT) foram realizadas diluições a 50%, 10% e 5% preliminarmente a fim de averiguar o comportamento dos diferentes componentes e das pastas endodônticas idealizadas frente ao controle positivo que possuía células sem tratamento, a viabilidade celular pode ser observada pela intensidade da cor azul purpúrea (Figura 5.1).

Os resultados estão ilustrados por gráfico na Figura 5.2, e a significância estatística dos resultados entre os grupos pode ser avaliada no Quadro 5.1. Todos os grupos tiveram um decréscimo da absorbância conforme a concentração aumentava, no entanto não foram todos valores com diferenças significativas estatisticamente. Nas diluições de 5%, os grupos Ca(OH)_2 e $\text{EGB} + \text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO}$ extrapolaram os limites deste ensaio para a leitura de absorbância. O $\text{EGB} + \text{Ca(OH)}_2$ e o EGB não tiveram diferença estatisticamente significativa do controle, com viabilidade celular de 92%; os grupos do ZnO e $\text{EGB} + \text{ZnO}$ ficaram com valores de 68% e 56%, respectivamente, ambos estatisticamente diferentes em relação ao controle.

Nas diluições de 50%, todos os grupos tiveram diferenças significativas em relação ao controle e sem diferença entre eles, seus valores de citotoxicidade foram extremamente elevados, com o máximo de viabilidade celular de 2% e o grupo do $\text{EGB} + \text{ZnO} + \text{Ca(OH)}_2$ obteve valor negativo provavelmente por ter eliminado todas as células, alterando as propriedades ópticas dessa amostra e, conseqüentemente, a leitura da absorbância foi comprometida. Nas diluições de 10%, os grupos do Ca(OH)_2 e $\text{EGB} + \text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO}$ não tiveram diferença estatística significativa do controle nem entre eles, apresentaram viabilidade celular de 97% e 84%, respectivamente; o grupo do EGB teve diferença estatística significativa do controle e com 56% das células viáveis; os grupos ZnO, $\text{EGB} + \text{ZnO}$ e $\text{EGB} + \text{Ca(OH)}_2$ não tiveram diferença

estatística entre eles e com diferença significativa em relação ao controle, sua viabilidade celular foi baixa, apresentando 24%, 32% e 33%, respectivamente. O teste ANOVA apresentou $p \leq 0,0001$, o modelo de estudo é válido.

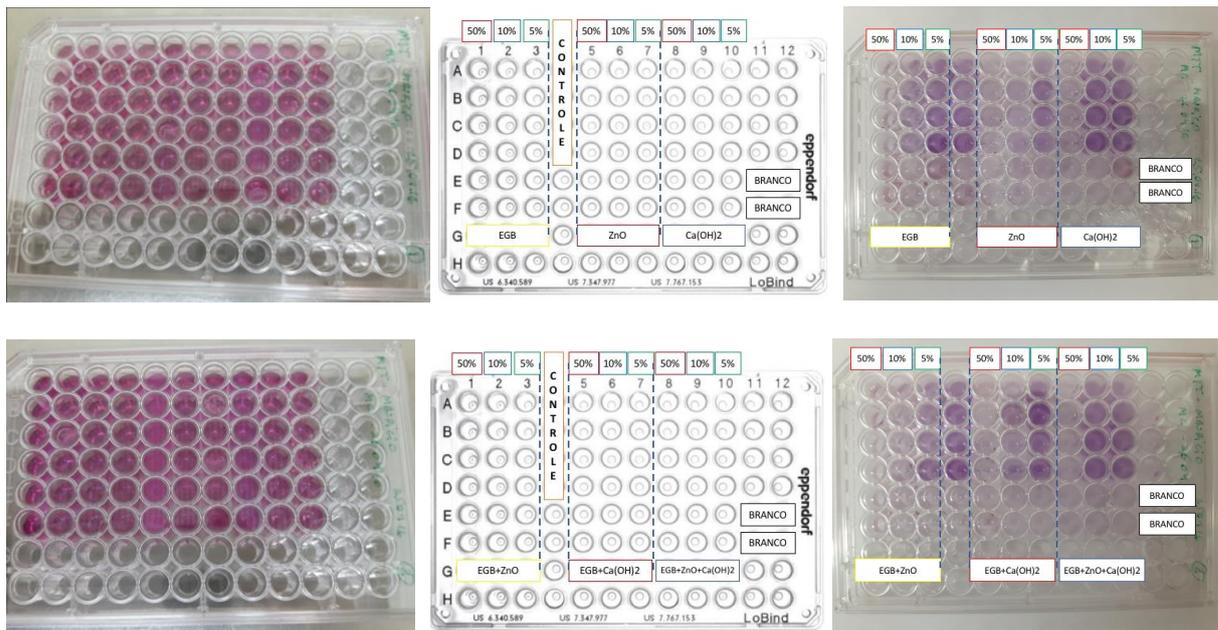


Figura 5.1 – Resultado ensaio MTT. Meio de cultura DMEM (à esquerda) nas Microplacas de 96 poços e após ensaio com o sal MTT convertido em um formazan de cor azul purpúrea (à direita), que indica a viabilidade celular. Ao centro: esquemas da distribuição dos grupos e suas diluições de 50%, 10% e 5%, com a indicação das linhas em que foi realizada a leitura de absorbância do branco (sem células) pelo espectrofotômetro. Acima: Microplaca com os grupos EGB, Controle, ZnO, Ca(OH)₂. Abaixo: Microplaca com os grupos EGB+ZnO, Controle, EGB+Ca(OH)₂, EGB+ZnO+Ca(OH)₂.

Resultados do Ensaio de Viabilidade Celular com Tetrazólio

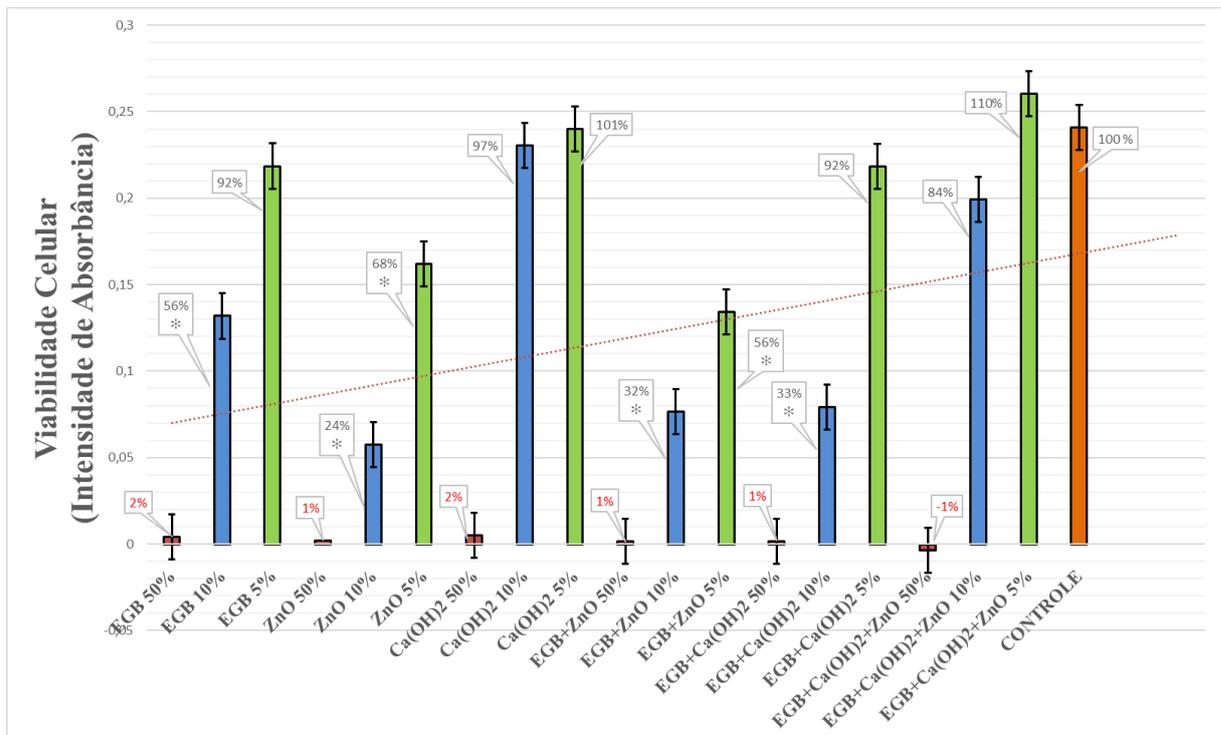


Figura 5.2 – Gráfico dos dados do ensaio de Viabilidade Celular com MTT. A linha de tendência mostra que quanto mais diluídas as amostras dos grupos, maior a absorbância encontrada. Balões indicam a porcentagem de células viáveis em cada grupo, valores a partir de 70% (ISO 10993-5, 2009) são considerados satisfatórios. Todos os grupos com diluição de 50% foram citotóxicos e diferentes do controle. O símbolo * indica outros grupos considerados estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA $p \leq 0,0001$, teste de Tukey).

Quadro 5.1

Ensaio de tetrazólio (MTT): Resultado do teste de Tukey
Letras distintas apresentam diferença estatística significante

Grupos	Concentrações dos Tratamentos			
	50%	10%	5%	100%
EGB	i	e, g	a, e	-----
ZnO	i	h	f, g	-----
Ca(OH) ₂	i	a, d	a, c	-----
EGB+ZnO	i	h	g	-----
EGB+Ca(OH) ₂	i	h	a, c	-----
EGB+Ca(OH) ₂ +ZnO	i	b, c, d, e, f	a	-----
Controle	-----	-----	-----	a, b

5.2 Viabilidade Celular: ensaio de resazurina (AlamarBlue™)

O experimento com resazurina (AlamarBlue™), feito com a diluição dos grupos a 10%, obteve um resultado melhor da viabilidade celular quando comparado ao ensaio de tetrazólio, conforme pode ser observado na Figura 5.3. Os dados foram indicados pelas leituras da fluorescência emitida pela resofurina de coloração rosa no espectrofotômetro (Figura 5.4), que foi produto da redução da resazurina pela atividade mitocondrial das células vivas. De acordo com o teste de Tukey, o grupo do EGB+ZnO apresentou-se estatisticamente similar ao EGB, que teve a menor fluorescência detectada, mas com viabilidade celular próxima de 70%, portanto satisfatória (ISO 10993-5, 2009). Também apresentaram semelhança estatística ao grupo EGB+ZnO os grupos ZnO, EGB+Ca(OH)₂, EGB+ZnO+Ca(OH)₂. Contudo os grupos EGB e EGB+ZnO foram diferentes estatisticamente do grupo controle e do Ca(OH)₂. O grupo Ca(OH)₂ apresentou uma leitura de fluorescência semelhante ao grupo controle. O teste ANOVA apresentou $p < 0,05$, o que valida o modelo de estudo.

Resultados do Ensaio de Viabilidade Celular com Resazurina

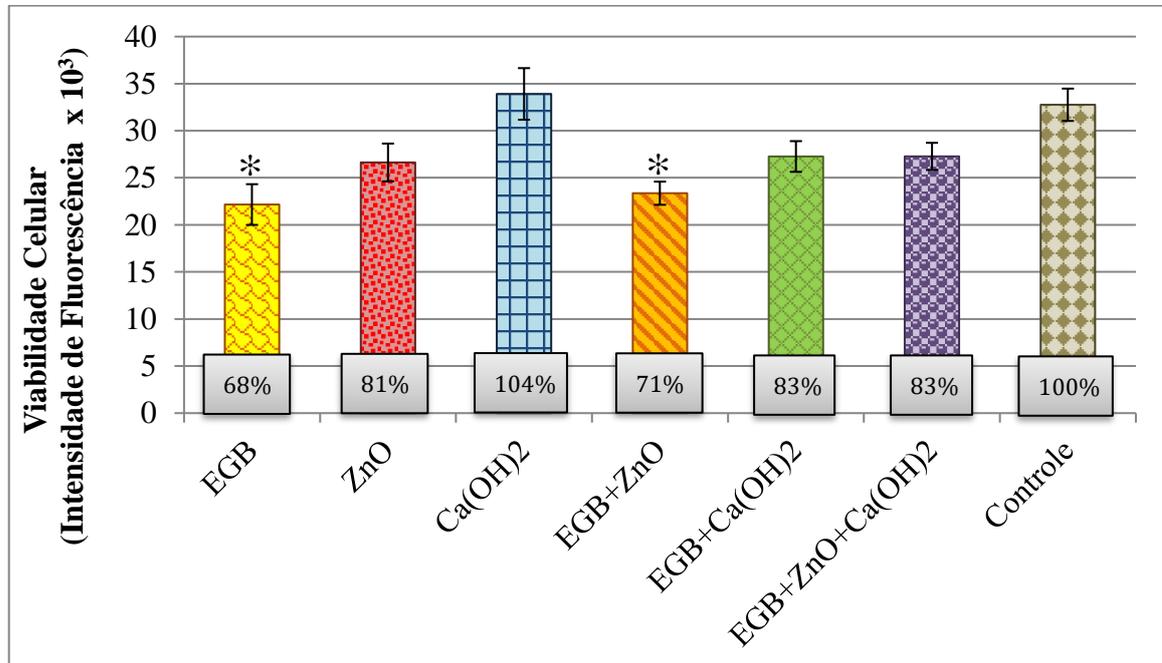


Figura 5.3 – Gráfico dos dados do ensaio de Viabilidade Celular com resazurina (AlamarBlue™). Os grupos EGB e EGB+ZnO foram semelhantes estatisticamente entre si e a todos os outros grupos, exceto ao grupo controle e ao grupo do Ca(OH)₂ (ANOVA $p < 0,05$; Teste de Tukey). Os valores de fluorescência encontrados de todos os grupos são considerados satisfatórios para Viabilidade Celular, levando-se em consideração a barra de erros, todos os valores apresentaram valores maiores ou próximos a 70% (ISO 10993-5, 2009).



Figura 5.4 – Leitura de microplaca do ensaio de resazurina.

5.3 Genotoxicidade: ensaio de micronúcleos (Vectashield® - DAPI)

A contagem de células que apresentavam micronúcleos foi realizada para avaliar a genotoxicidade, de forma que foram contadas mil (1000) células por grupo experimental, conforme exposto na Tabela 5.1.

Tabela 5.1

Dados obtidos pelo ensaio de genotoxicidade. Contagem de micronúcleos em células FMM1 expostas a meio de cultura DMEM condicionado por pastas endodônticas à base de Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (banana) e por seus componentes isoladamente

Grupos Experimentais	Número micronúcleos	Número de células	Porcentagem
Grupo 1 – EGB	1	1000	0,1%
Grupo 2 – ZnO	0	1000	0%
Grupo 3 – Ca(OH)₂	2	1000	0,2%
Grupo 4 – EGB + ZnO	1	1000	0,1%
Grupo 5 – EGB + Ca(OH)₂	1	1000	0,1%
Grupo 6 – EGB + ZnO + Ca(OH)₂	0	1000	0%
Grupo 7 – Controle Positivo (DMEM com FMM1)	2	1000	0,2%

Os grupos do ZnO e EGB+ZnO+Ca(OH)₂ não tiveram micronúcleos. Os grupos do EGB, EGB+ZnO e EGB+Ca(OH)₂ apresentaram o valor de 0,1%, enquanto os grupos Ca(OH)₂ e Controle tiveram o valor de 0,2% (Figura 5.5). Nenhum dos grupos foi considerado genotóxico.

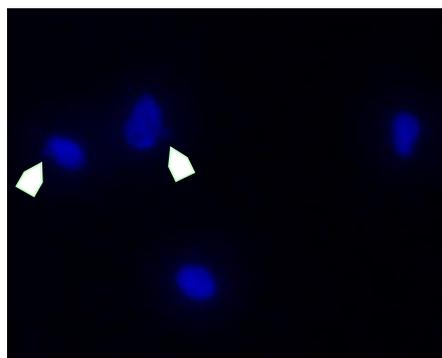


Figura 5.5 – Fotomicrografia de micronúcleo. Observação em microscópio (aumento de 400x) de núcleos celulares fluorescentes corados por DAPI. Nos destaques, dois micronúcleos notados no grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Dentro do contexto da bioprospecção de bioprodutos para uso endodôntico compostos por um veículo de origem natural e que, conforme nossos estudos anteriores (SILVA, 2018), apresentaram ação antimicrobiana e possuem biomoléculas com possível ação imunomoduladora, tivemos nesse trabalho o principal objetivo de avaliar a biocompatibilidade *in vitro* dos seus componentes individualmente e das novas pastas endodônticas à base de Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (banana - EGB) para serem usadas no tratamento de dentes permanentes e de dentes decíduos. Assim, almeja-se que as propostas apresentadas possuam propriedades semelhantes ou que superem outras alternativas disponíveis comercialmente para o uso odontológico, sendo digno de nota a disponibilidade e o baixo custo de seus componentes. A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de tetrazólio (MTT) e de resazurina (AlamarBlue™). A genotoxicidade foi verificada pelo ensaio de micronúcleos. Os resultados encontrados seguem nessa discussão com a finalidade de trazer a projeção de um possível significado clínico com segurança sobre as metodologias aplicadas.

Os resultados do EGB isolado na diluição a 10% foram 56% para o MTT e 68% para a resazurina e não foi genotóxico no ensaio de micronúcleos. O EGB apresentou viabilidade celular entre 50% e 70%, fato que é esperado de biomateriais que possuem atividade antimicrobiana, pois uma alta biocompatibilidade, como a da diluição a 5% do ensaio de MTT, poderia anular o efeito terapêutico adicional de um produto para o tratamento endodôntico, enquanto elevadas concentrações do EGB poderiam ser citotóxicas, como verificado na diluição a 50% no ensaio de MTT. Portanto consideramos esse resultado satisfatório para a biocompatibilidade *in vitro* do EGB, pois mantém a viabilidade celular em um patamar mediano, considerado seguro para aplicação clínica (BADR et al., 2011; SARIGOL et al., 2010).

O ZnO apresentou resultados divergentes, com baixa viabilidade celular no ensaio de MTT e alta viabilidade celular no ensaio de resazurina na diluição a 10%. Esse grupo experimental também foi citotóxico a 50% no ensaio de MTT, mas a 5% permaneceu diferente estatisticamente do controle, com viabilidade celular de 68%. Há descrição de diferentes fatores

que podem favorecer a citotoxicidade ou viabilidade do ZnO, podendo ser dependente de sua concentração (LEE et al., 2016), mas também do pH do meio (ZHANG et al., 2013). Contudo a literatura em nanotecnologia indica a biocompatibilidade do ZnO (GOPIKRISHNAN et al., 2010; LI et al., 2008). Considerando que os resultados de viabilidade celular a 10% foram patamares bem acima da viabilidade celular mediana, visto que o ZnO é um material com propriedades antimicrobianas, acreditamos que o resultado indica segurança (BADR et al., 2011; SARIGOL et al., 2010), ainda sendo associado à ausência de genotoxicidade, portanto há biocompatibilidade *in vitro*.

O Ca(OH)₂ apresentou uma viabilidade celular altamente satisfatória nas diluições de 5% e 10%, sendo equivalentes estatisticamente ao grupo controle, tanto no ensaio de MTT quanto de resazurina, não sendo genotóxico no ensaio de micronúcleos. Baixas concentrações de Ca(OH)₂ são verificadas na literatura como biocompatíveis (ESTRELA; HOLLAND, 2003; NELSON FILHO et al., 1999). Ainda assim concentrações elevadas desse material são verificadas como citotóxicas (KAUR et al., 2015). Em nosso trabalho os resultados encontrados corroboraram com a literatura já que, nas concentrações baixas, o Ca(OH)₂ foi biocompatível, enquanto que na diluição de 50% do ensaio de MTT apresentou citotoxicidade.

A composição de pastas endodônticas possui grande variabilidade, incluindo antibióticos, biocidas, compostos fenólicos, não-fenólicos, iodo, contudo essas diversas associações ainda não suprem todas as necessidades do profissional e suas propriedades dependem de qual veículo é empregado para propiciar melhor desempenho clínico (CHEN; KAO; HUANG, 2005; LIMA et al., 2015a; PIRES et al., 2016). O EGB é uma boa alternativa de veículo para uma nova pasta endodôntica, já que há estudo que demonstra sua atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e a existência de biomoléculas que podem auxiliar na resposta celular do organismo e, conseqüentemente, no reparo tecidual periapical (SILVA, 2011). A combinação de ZnO e de Ca(OH)₂ em pastas endodônticas possui indicações na literatura de um melhor desempenho para o tratamento endodôntico (ATHANASSIADIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2009; SILVA, 2015). Contudo, a associação de ZnO e de Ca(OH)₂ utilizando veículos inertes possui resultados insatisfatórios na atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas resistentes (HEGDE et al., 2012; SILVA et al., 2013). Composições diferentes estão disponíveis para pastas endodônticas iodoformadas com alto potencial antimicrobiano, boa resposta biológica e sucesso clínico (LACATIVA; LOYOLA; SOUSA, 2012; PIRES et al., 2016; SARIGOL et al., 2010).

A diluição de 50% neste ensaio de MTT foi citotóxica e a viabilidade celular observada na diluição de 5% do EGB+ZnO foi de 56% e do EGB+Ca(OH)₂ foi de 92%, sendo que aumentou para 110% no EGB+ZnO+Ca(OH)₂, quando Zn e Ca estavam combinados; na diluição de 10%, houve aumento com maior significância de 32% e 33%, respectivamente, para 84%. Já no ensaio de resazurina a viabilidade do EGB+ZnO de 71% aumentou significativamente com o acréscimo de Ca(OH)₂ para 83% no EGB+ZnO+Ca(OH)₂, ao passo que o EGB+Ca(OH)₂ apresentou também 83%. Um estudo *in vivo* em dentes de cães comprova a biocompatibilidade pela avaliação histopatológica da combinação de ZnO e Ca(OH)₂ usando o veículo polietileno glicol 400 (PEG) (SILVA et al., 2010).

A citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de MTT da mistura de ZnO e Ca(OH)₂ com dois veículos propileno glicol e PEG, ambos hidrossolúveis viscosos, foi avaliada em leucócitos nos intervalos de 24 e 72 horas, sendo que os extratos possuíam elevada concentração, resultaram em viabilidade celular acima de 140%, em ambos períodos (PIRES et al., 2016). Os autores justificam esses resultados devido a uma proliferação celular induzida pelo Ca(OH)₂ que é capaz de promover o reparo tecidual em razão de desencadear uma resposta inflamatória (NELSON FILHO et al., 1999; PIRES et al., 2016). Esses resultados divergem das diluições de alta concentração (50%) deste ensaio de MTT e corroboram com os ensaios deste estudo nas diluições de 5% e 10% de alguns dos grupos que tinham o Ca(OH)₂ como componente de pastas.

Em contrapartida, outro estudo com grupos de pastas de Ca(OH)₂ e pastas iodoformadas apresentou menor citotoxicidade em fibroblastos L929 de roedores para as pastas iodoformadas (SARIGOL et al., 2010). Ainda se considerando as pastas iodoformadas, um ensaio de avaliação histológica de implantes intraósseos em porcos guinea indicou níveis aceitáveis de biocompatibilidade em menor tempo que os outros grupos, sendo que o Ca(OH)₂ teve biocompatibilidade aceitável após 12 semanas (LACATIVA; LOYOLA; SOUSA, 2012). Nestes estudos existiam pastas avaliadas com o ZnO e eugenol em alguns grupos, mas nunca o ZnO estava presente sem o eugenol, fato que pode ter colaborado com a citotoxicidade encontrada nestes grupos. A avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das pastas endodônticas com EGB é um passo importante para observar sua resposta biológica no tratamento endodôntico.

O uso do meio de cultura condicionado diluído é relevante para nossos estudos *in vitro*, já que procura simular o microambiente do periápice radicular. Clinicamente os materiais serão colocados dentro dos canais e as substâncias eluídas diluirão nos vasos sanguíneos e linfáticos.

Candeiro et al. (2016) dissolveram o meio condicionado dez vezes para avaliar a citotoxicidade, obtendo o meio condicionado a 10%, o qual prevalece com as características apropriadas para o estudo laboratorial comparativo. Cavalcanti et al. (2005) corroboram com essa afirmação e utilizaram apenas a diluição a 10% usada também neste estudo, avaliando ainda que o Ca(OH)_2 permitiu elevada viabilidade celular em seu experimento. O meio de cultura DMEM possui tamponamento pelo bicarbonato de sódio, fato a ser considerado na avaliação dos resultados com alta viabilidade celular do experimento observada nos grupos experimentais com Ca(OH)_2 .

Discorda dos resultados de Cavalcanti et al. (2005) e os deste nosso estudo uma metanálise sobre cimentos endodônticos em que o Ca(OH)_2 e o ZnO e eugenol foram considerados biotóxicos, quando comparados a cimentos resinosos (KAUR et al., 2015). Estudos na literatura sobre a citotoxicidade de cimentos endodônticos com Ca(OH)_2 apresentam resultados divergentes quanto à viabilidade celular. A comparação entre cimentos e pastas endodônticas deve ser feita com cautela, já que é importante considerar que também os salicínatos estão presentes na composição de alguns cimentos endodônticos, podendo ser responsáveis por colaborar nos resultados de baixa viabilidade celular encontrados na literatura, observando-se ainda a rápida decomposição dos materiais à base de Ca(OH)_2 em ambientes úmidos (PAWIŃSKA et al., 2015). Ainda assim, vale ressaltar que há cimentos endodônticos com Ca(OH)_2 em sua composição, Sealapex e Apexit, que foram avaliados para a citotoxicidade de células 3T3 e apresentaram resultados favoráveis e viabilidade celular acima de 80% (GEURTSSEN et al., 1998). Chen et al. (2005) avaliaram pastas endodônticas para dentes decíduos, dentre elas aquela à base de Ca(OH)_2 e iodofórmio obteve a melhor viabilidade celular.

A medicação intracanal mais utilizada é a pasta endodôntica de Ca(OH)_2 e sua ação local tem relação com o pH elevado, solubilização de tecidos orgânicos, estimulação de neoformação óssea, capacidade de inativar endotoxinas. Os veículos utilizados nas pastas de Ca(OH)_2 interferem em suas propriedades físicas e biológicas, levando em conta a dissociação de OH^- e Ca^{2+} , podendo ser hidrossolúveis aquosos, hidrossolúveis viscosos ou oleosos, sabendo que a velocidade de dissociação é maior nos aquosos, intermediária nos viscosos e menor nos oleosos (ESTRELA; HOLLAND, 2003), sua aplicação clínica tem sido vinculada ao tipo de veículo. O EGB é um veículo hidrossolúvel viscoso que possui pH ácido.

Em contrapartida, o grupo EGB+ Ca(OH)_2 apresentou baixa viabilidade celular na diluição a 10% do ensaio de MTT, semelhante estatisticamente ao EGB+ZnO, como também ao ZnO quando avaliado isoladamente. Garrido et al. (2015) avaliaram a citotoxicidade de um

cimento endodôntico à base de óleo de copaíba (Biosealer[®]) que possui resinas naturais de pH baixo, característica similar ao EGB, e podem ser responsáveis pelo aumento da permeabilidade celular e, conseqüentemente, da citotoxicidade. Um dos objetivos de incorporar o ZnO na fórmula de Biosealer[®] foi para diminuir a citotoxicidade das resinas naturais, já que possui efeito citoprotetor. Este fato se contrapõe com o resultado do ensaio de MTT em que a adição de ZnO ao EGB provocou maior citotoxicidade *in vitro*, fato coincidente com a adição do Ca(OH)₂ ao EGB. Todavia, a pasta EGB+Ca(OH)₂+ZnO que combina as três substâncias apresentou melhor viabilidade celular na diluição a 10%.

O ensaio de resazurina foi realizado após o de MTT, que apresentou resultados de viabilidade celular razoavelmente medianos na diluição de 10% dos meios de cultura condicionados por cada grupo, com exceção dos grupos que ficaram acima de 80% (Ca(OH)₂ e da pasta EGB+ZnO+Ca(OH)₂), e, por conseguinte, foi usada apenas essa diluição de 10% para o ensaio de resazurina, já que materiais endodônticos com propriedades antimicrobianas não podem apresentar biocompatibilidade nem muito elevada, nem muito baixa, para manter sua ação terapêutica com segurança, corroborando com outros estudos (BADR et al., 2011; CANDEIRO et al., 2016; CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005; SARIGOL et al., 2010).

Os resultados obtidos pelo ensaio de resazurina foram diferentes daqueles do ensaio de MTT. O grupo do EGB e do EGB+ZnO foram estatisticamente diferentes do controle, com valores de viabilidade celular de 68% e 71%, respectivamente, portanto próximos de 70%, mas contrapondo-se com os do ensaio de tetrazólio de 56% e 32%, na mesma diluição de 10%. Esses mesmos grupos obtiveram pouco incremento de viabilidade celular com o aumento da diluição no ensaio do MTT, em conjunto com o EGB+Ca(OH)₂, que apresentou no ensaio de resazurina uma viabilidade de 83%, muito distante dos 33% do ensaio de MTT.

Os resultados do ensaio de resazurina foram considerados satisfatórios para a viabilidade celular, sendo todos os outros grupos acima de 80%, ressalta-se apenas o grupo Ca(OH)₂ com valores que extrapolaram os limites de leitura de fluorescência, enquanto no ensaio de MTT o mesmo grupo na mesma diluição apresentou 97% de viabilidade celular.

As pastas de Ca(OH)₂ no ensaio de resazurina apresentaram maior viabilidade celular do que a de 76% obtida pelo cimento de Ca(OH)₂ com veículo oleoso (L&C - Dentsply Herpo, Petrópolis, RJ, Brasil) de outro estudo em que se utilizou o ensaio de azul de Trypan e células THP-1 em meio de cultura condicionado com diluições seriadas, inclusive a 10%. Os autores ainda apontam a discrepância dos resultados de ensaios de citotoxicidade *in vitro* encontrada

na literatura entre ensaios diferentes (CORREA et al., 2009), assim como ocorreu entre os ensaios de MTT e de resazurina utilizados por este estudo.

As células de fibroblastos de mucosa mastigatória (FMM1) foram utilizadas para o estudo de citotoxicidade *in vitro* e diferenças fenotípicas com outras células não são significantes para os resultados obtidos no período de 24 horas, já que são considerados testes de toxicidade de curto prazo (PAWIŃSKA et al., 2015), fato que corrobora com a metodologia dos ensaios realizados com este intervalo nesta pesquisa.

O uso de pastas endodônticas dentro de canais radiculares torna sua interação biológica específica. A metodologia do experimento que simula o efeito dos materiais utilizados no tratamento endodôntico deve ser criteriosa e se aproximar ao máximo do que ocorre em ensaios clínicos com humanos (COSTA et al., 2014). Outros aspectos a serem observados sobre os resultados de testes de ensaio de citotoxicidade divergentes estão relacionados com as técnicas preparatórias e o exame das amostras de materiais, que podem ficar em contato direto ou indireto com as células (PAWIŃSKA et al., 2015).

O condicionamento do meio de cultura é apropriado para analisar a dissolução ou lixiviação de substâncias provenientes da pasta endodôntica em decorrência de sua manipulação. As pastas endodônticas são colocadas dentro dos canais radiculares em sua indicação clínica, cujo ambiente apresenta umidade que precisa ser reproduzida laboratorialmente para que o método de análise seja relevante. Os meios de cultura celular são condicionados para mimetizar essas características clínicas e o contato indireto entre as células e os materiais avaliados, inclusive a interferência do microambiente intracanal sobre as propriedades das pastas endodônticas (CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005).

O uso de membranas semipermeáveis para preservação das células do experimento também é uma alternativa para esta técnica (PAWIŃSKA et al., 2015), colocando-se os materiais imediatamente manipulados sobre a membrana, embora neste caso não haja controle sobre as concentrações dos elutos provenientes dos materiais testados, o que é divergente do método que foi realizado neste estudo com a determinação das diferentes diluições dos meios de cultura condicionados, no caso do ensaio de MTT, ou com a diluição de 10% para o ensaio de resazurina.

O contato direto das pastas endodônticas com as células cultivadas é realizado para simular o extravasamento desse material além do ápice radicular (COTTI et al., 2014b). Contudo, a aplicação desses materiais diretamente em células cultivadas é extremamente agressiva e fica difícil extrapolar os resultados de citotoxicidade para sua aplicação clínica. A

eluição dos componentes das pastas, condicionando o meio de cultura para fazer o tratamento das células, permite conceber a reação à distância dos materiais endodônticos aplicados dentro dos canais radiculares nas células do tecido periapical (CANDEIRO et al., 2016; SCENZA et al., 2012), o que está de acordo com o método eleito para esta pesquisa.

Em paralelo, deve ser considerada a interação com as células dos reagentes dos ensaios de citotoxicidade selecionados para este estudo. O MTT é reduzido principalmente pelas enzimas oxidoreductase em consonância com a atividade de desidrogenase mitocondrial. Em contrapartida, a resazurina participa por essas e outras vias da fosforilação oxidativa, aumentando sua eficácia. Além disso, no ensaio de MTT há formação de cristais pontiagudos azul purpúreos de formazan insolúveis no meio de cultura, por esse motivo, existe a necessidade de remoção do meio e utilização de um solvente orgânico para diluição dos cristais antes da leitura da absorbância. A quantidade de células mortas suspensas em razão dos cristais pontiagudos de formazan é imprevisível e aumenta o desvio padrão entre os poços das placas, diminuindo a sensibilidade dos resultados do ensaio. A resazurina é solúvel no meio de cultura, dispensando essas etapas requeridas no ensaio de MTT, permitindo uma técnica simples e com menor possibilidade de erros, o ensaio com resazurina torna-se superior àqueles com MTT (XU; MCCANNA; SIVAK, 2015).

Para avaliar os dados dos ensaios, cabe notar que o EGB sem nenhuma diluição tem valor de pH entre 4,0 e 6,0, que provavelmente se alterou quando foi feito o condicionamento do meio de cultura com esse componente, pelo tampão do bicarbonato presente no DMEM. Permite-se assim compreender que o ensaio com EGB isolado colaborou em reduzir o pH, no entanto o MTT pode promover uma acidificação adicional, já que é notório o rompimento da membrana citoplasmática causado pelos cristais de formazan, sendo esta uma hipótese que explica a diferença entre os resultados dos ensaios de MTT e resazurina para o ZnO e para as pastas de EGB+ZnO e de EGB+Ca(OH)₂ a 10%, já comentado anteriormente. Ao contrário do ensaio do MTT, o ZnO no ensaio da resazurina adicionado ao EGB levou a um aumento de sua viabilidade celular, corroborando com o efeito citoprotetor do Zn quando associado a resinas ácidas de produtos naturais, formando resinatos de zinco, diminuindo a toxicidade, de acordo com um estudo de citotoxicidade *in vitro* em polimorfonucleares e em fibroblastos de mucosa mastigatória (SUNZEL et al., 1997).

Com o intuito de esclarecer os resultados supracitados, existe a hipótese de o ZnO interagir em sistema biológico de maneira distinta conforme o pH se altera, visto que o aumento de sua solubilidade é proporcional à diminuição do pH de 7,2 (fisiológico) para 5,5 (ácido).

Considerando que os grupos experimentais que o possuíam oportunizaram a entrada desse elemento nas células, podendo haver superexpressão de ERO, disfunção mitocondrial e morte celular (WANG et al., 2014), outrossim a citotoxicidade também está diretamente relacionada com a queda de pH proporcionada pelos reagentes do ensaio, no caso dos cristais de formazan produzidos no ensaio de MTT (XU; MCCANNA; SIVAK, 2015).

Um conjunto de ensaios para avaliar a biocompatibilidade é considerado ideal (SCELZA et al., 2012), incluindo análise morfológica, função enzimática e interação da célula com o biomaterial. A biocompatibilidade de materiais biológicos está fortemente relacionada com a genotoxicidade, que indica a presença de componentes reativos com o DNA que podem ser responsáveis por carcinogenicidade e/ou mutagenicidade (ELDENIZ et al., 2015). O estresse oxidativo celular, promove maior expressão molecular de ERO, as quais podem refletir na alteração de ácidos nucleicos, provocando inclusive a quebra de cromossomos. Dentre os vários ensaios *in vitro* sobre genotoxicidade, o ensaio de micronúcleos pode ser utilizado para detectar essa aberração citogenética, que se trata de diminutas estruturas celulares originadas de alterações cromossomiais (perda ou fragmentação) ou comprometimento estrutural de fusos mitóticos (PIZZAIA, 2013).

Os ensaios pré-clínicos são previstos para o uso de novas terapias com bioprodutos e permitem verificar a biocompatibilidade dos materiais em pauta, neste caso por meio da avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade. Nenhum grupo experimental foi considerado genotóxico neste estudo, em que se empregou o ensaio de micronúcleos com o meio de montagem com DAPI.

Outro estudo que buscou dados de genotoxicidade sobre diversas pastas endodônticas utilizadas em decíduos verificou que não houve quebra de DNA em células humanas de osteossarcoma pelas pastas com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, corroborando com os resultados aqui encontrados (HUANG et al., 2009). Por outro lado, um estudo que avaliou a genotoxicidade por meio do ensaio alcalino de cometa e o ensaio de capacidade de modificação genética apresentou resultados divergentes daqueles descritos por este estudo sobre as pastas com ZnO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sendo capazes de induzir dano no DNA de leucócitos. Ressalta-se que a concentração dos extratos era $500\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, bem maiores do que no primeiro estudo citado ($5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (PIRES et al., 2016) e, também, do que a deste estudo que usou meio condicionado a 10%.

Santos et al. (2016) verificaram a genotoxicidade *in vivo* de pastas endodônticas para dentes decíduos pela contagem de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea de murinos (*Mus musculus*) expostos via parenteral por injeção intraperitoneal. A pasta de ZnO e eugenol

(IRM[®], Dentsply, Petrópolis, Brasil) foi diluída em DMSO e a de Ca(OH)₂ P.A.[®] (Biodinâmica Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda, Ibiporá, Brasil) em PBS. Os resultados indicaram genotoxicidade para o ZnO e eugenol e o Ca(OH)₂ foi considerado biocompatível, contudo o eugenol provavelmente contribuiu para os resultados de genotoxicidade desse estudo de Santos et al. (2016).

O ZnO é um dos componentes principais das pastas propostas neste estudo e existe pesquisa sobre nanopartículas que evidencia sua genotoxicidade pela quebra de DNA causados diretamente por meio de íons Zn²⁺, não somente pela interferência da expressão molecular de ERO. No mesmo experimento citado pode ser observado aumento de células viáveis expostas às menores concentrações de ZnO quando comparados ao grupo controle sem tratamento, contudo sem relevância estatística. Isso sugere que níveis moderados da expressão de ERO estimulam vias de promoção de crescimento celular. A dissociação do ZnO depende de vários fatores, tais como as características das partículas do pó e o solvente utilizado (HEIM et al., 2015).

Nossa pesquisa utilizou o pó de ZnO com EGB, um veículo hidrossolúvel viscoso de pH baixo, com a hipótese de média viscosidade disponibilizar lentamente o Zn²⁺ para os tecidos vivos. Haveria diferença de características físico-químicas caso fosse utilizado um veículo aquoso de baixa viscosidade, o qual causaria sua rápida absorção e sua alta concentração intracelular e, conseqüentemente, aumentaria o risco de toxicidade (HEIM et al., 2015; ZHANG et al., 2013), portanto é provável que por este motivo não foram encontrados resultados de genotoxicidade para o ZnO em nossa pesquisa.

A avaliação da genotoxicidade é essencial para aprovar novos fármacos para uso comercial no Brasil, conforme salientado em uma pesquisa do extrato glicólico de *B. pendula* (bétula) que também utilizou o ensaio de micronúcleos com DAPI, cuja contagem não indicou alterações significativas (JESUS, 2016). Pode-se considerar esperado que materiais com baixa citotoxicidade apresentem baixa genotoxicidade, como observado pelos autores que avaliaram esses aspectos em novas propostas de cimentos endodônticos à base de *C. multijuga* (copaíba) e *R. communis* (mamona), em que a contagem de micronúcleos também não resultou em genotoxicidade (SILVA et al., 2016), resultados semelhantes aos de nosso estudo. Como contraponto, outro estudo que avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* de pastas endodônticas com ZnO e Ca(OH)₂ como componentes, apresentaram alta viabilidade celular e ao mesmo tempo foram constatados danos ao DNA. De acordo com os autores, esses fatos são justificados pelo processo de divisão celular dos leucócitos sem o objetivo de reparo tecidual,

que se perpetuou no material genético daquela linhagem, provocando maior suscetibilidade aos danos provocados pelo estresse oxidativo ao DNA (PIRES et al., 2016).

A biocompatibilidade dos materiais utilizados nos tratamentos endodônticos é essencial, mas depende de outros fatores para o sucesso clínico. A resposta favorável aos agentes infecciosos e inflamatórios pode ser aprimorada pela interação biológica dos materiais endodônticos com o periápice dental, ligamento periodontal e osso alveolar. Os elementos constituintes do tratamento endodôntico interferem por eluição ou por contato direto com os tecidos periapicais e promovem diferentes interações moleculares, benéficas ou não. O retardo ou impedimento do processo de reparo biológico dos tecidos periapicais não são oportunos no tratamento endodôntico, portanto analisar isoladamente a biocompatibilidade dos materiais utilizados é insuficiente (SILVA et al., 2016).

Os resultados destes ensaios *in vitro* aqui descritos são restritos e figuram reações citológicas específicas elaboradas em um ambiente controlado. Há quadros multivariados que demandam conhecimento específico das patologias pulpares. Cabe o entendimento de que o desempenho clínico do tratamento endodôntico é dependente do diagnóstico inicial. Quanto maior a severidade das lesões, maior o desafio para alcançar o sucesso clínico. As técnicas aplicadas com exatidão para a sanificação da complexa anatomia do sistema de canais radiculares são essenciais para o bom resultado do tratamento. O extravasamento inadvertido de material pelo ápice implica em menor chance de sucesso no tratamento. Polpas dentárias que apresentam infecção deveriam ser tratadas em duas ou mais sessões utilizando uma medicação intracanal efetiva a fim de reduzir a microflora patogênica (RICUCCI et al., 2011). Novas pesquisas devem assegurar uso de EGB isolado como medicação intracanal e, ainda, como protocolo de sessão única após a instrumentação do sistema de canais radiculares, já que se trata de um potencial veículo endodôntico ativo. As novas pastas endodônticas podem ser da mesma forma validadas com novos estudos para o uso clínico no tratamento endodôntico de dentes permanentes e decíduos, além de poderem inspirar um futuro cimento endodôntico a ser formulado para a obturação do sistema de canais radiculares de dentes permanentes.

7. CONCLUSÃO

A hipótese nula foi aceita, já que considerava que tanto as pastas endodônticas propostas, quanto os seus componentes isolados Extrato Glicólico de *Musa paradisiaca* (EGB), Ca(OH)_2 e ZnO não apresentariam citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*. A proposição da ação isolada do EGB ou, ainda, a combinação de suas biomoléculas com ZnO e/ou Ca(OH)_2 em uma nova pasta endodôntica tem a suposta ação antimicrobiana contra os patógenos das doenças pulpares e periapicais e, ao mesmo tempo, poderia modular a resposta imune exacerbada, fato ainda a ser comprovado em outros estudos, especialmente evitando a reabsorção óssea e promovendo sua neoformação por meio de regeneração tecidual com viabilidade celular satisfatória. Todavia, a eficácia e a especificidade antimicrobiana para o complexo biofilme endodôntico devem ainda ser avaliados por intermédio de diferentes parâmetros, como as condições fisiológicas *in vivo*, concentrações adequadas para uso clínico, ações sinérgicas e antagonistas e também as características de replicação microbiana. Estes parâmetros devem permitir a bioprospecção de um produto biotecnológico para o uso na Endodontia que seja viável economicamente e capaz de ser disponibilizado pela indústria farmacêutica ou de produtos odontológicos. Portanto, possuindo o EGB e as novas pastas endodônticas propostas potencial para uso endodôntico em dentes permanentes e dentes decíduos elas devem ser avaliadas em novas etapas mandatórias até viabilizar sua aplicação clínica.

8. REFERÊNCIAS

- AL-NAZHAN, S.; AL-OBAIDA, M. Effectiveness of a 2% chlorhexidine solution mixed with calcium hydroxide against *Candida albicans*. **Aust Endod J**, v. 34, p. 133–5, 2008.
- ALVES, E. J. **A cultura da banana: Aspectos técnicos, sócio-econômicos e agro-industriais**. 2º ed. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas, 1999.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- AMUTHA, K.; SELVAKUMARI, U. Wound healing activity of methanolic stem extract of *Musa paradisiaca* Linn. (Banana) in Wistar albino rats. **International Wound Journal**, n. 1742–481X (Electronic), p. 1–5, 2014.
- ATHANASSIADIS, B. et al. An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Australian Dental Journal**, v. 55, n. 2, p. 150–155, 2010.
- BADR, A. E.; OMAR, N.; BADRIA, F. A laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of Liquorice when used as root canal medicament. **Int End J**, v. 44, p. 51–8, 2011.
- BANKAR, A.; JOSHI, B.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, p. 45–50, 2010.
- BENNETT, R. N. et al. Phenolics and antioxidant properties of fruit pulp and cell wall fractions of postharvest banana (*Musa acuminata* juss.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7991–8003, 2010.
- BORGES, M. H.; ALVES, D. F. L.; RASLAN, D. S.; PIL´O-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **J Ethnopharmacol**, v. 98, p. 21-9, 2005.
- BRAGA, R. Plantas do Ceará. **Revista do Instituto do Ceará**, p. 145-75, 1949.
- BRASIL. MCTIC. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES. **Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação – 2016/2022: Ciência, tecnologia e inovação para o desenvolvimento econômico e social**. 2016. 132p.
- CANDEIRO, G. T. M. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 9, p. 858–64, 2016.
- CAVALCANTI, B. N.; RODE, S. M.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 8, p. 505–509, 2005.
- CHEN, C.; KAO, C.; HUANG, T. Comparison of the biocompatibility between 2 endodontic filling materials for primary teeth. **Journal of Dental Sciences**, v. 24, n. 1, p. 28–35, 2005.
- COE, F. G.; ANDERSON, G. J. Ethnobotany of the Sumu (ULwa) of southeastern Nicaragua and comparisons with Miskitu plant lore. **Economy Botany**, v. 53, n. 4, p. 363–86, 1999.

- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda, Para State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159–175, 2009.
- CORREA, G. T. B. et al. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 17, n. 5, p. 457–461, 2009.
- COSTA, C. A. DE S. et al. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. **Dental Materials**, v. 30, n. 7, p. 769–784, 2014.
- COTTI, E. et al. An overview on biologic medications and their possible role in Apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 12, p. 1902–1911, 2014a.
- COTTI, E. et al. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: An in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 124–128, 2014b.
- DESAI, S.; CHANDLER, N. Calcium Hydroxide–Based Root Canal Sealers: A Review. **J Endod**, v. 35, p. 475–80, 2009.
- DESHMUKH, M. H.; PAI, S. R.; NIMBALKAR, M. S.; PATIL, R. P. Biochemical Characterization of Banana Cultivars From Southern India. **Int J Fruit Science**, v. 9, n. 4, p. 305-22, 2009.
- EDDY, W. H.; KELLOGG, M. The Place Of The Banana In The Diet. **American Journal of Public Health**, p. 27-35, 1927.
- ELDENIZ, A. U. et al. DNA double-strand breaks caused by new and contemporary endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, p. 1–19, 2015.
- ENNOS, A. R.; SPATZ, A-Ch.; SPECK, T. The functional morphology of the petioles of the banana, *Musa textilis*. **J Experiment Botany**, v. 51, n. 353, p. 2085-93, 2000.
- ESTRELA, C.; BAMMANN, L. L.; PIMENTA, F. C.; PÉCORÁ, J. D. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **Int Endod J**, v. 34, p. 341-5, 2001.
- ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 11, n. 4, p. 269–82, 2003.
- ESTRELA, C.; PÉCORÁ, J. D.; SOUZA-NETO, M. D.; ESTRELA, C. R. A.; BAMMANN, L. L. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J**, v. 10, p. 63-72, 1999.
- GARRIDO, A. D. B. et al. Cytotoxicity evaluation of a copaiba oil-based root canal sealer compared to three commonly used sealers in endodontics. **Dental research journal**, v. 12, n. 2, p. 121–6, 2015.
- GEURTSSEN, W. et al. Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 85, n. 5, p. 592–597, 1998.
- GIORGETTI, M.; ROSSI, L.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - a study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 338–347, 2007.
- GOMES, B. P. F. A.; MONTAGNER, F.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; ALMEIDA, J. F. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. **Journal Of Dentistry**, v. 37, p. 76-81, 2009.
- GOMES, L. R. **Plantas medicinais e fitoterápicos utilizados na Odontologia**. 2008. 87 f.

Monografia (Graduação)-Graduação do curso de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, UFAM, Manaus, 2008.

GOPIKRISHNAN, R. et al. Synthesis , characterization and biocompatibility studies of zinc oxide (ZnO) nanorods for biomedical application. **Nano-Micro Letters**, v. 2, n. 1, p. 31–36, 2010.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 81–100, 2002.

HARGREAVES, K. M.; BERMAN, L. H. **COHEN: Caminhos da polpa**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HEGDE, S. et al. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 2012.

HEIM, J. et al. Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. **Nanoscale**, v. 7, n. 19, p. 8931–8, 2015.

HUANG, T. H. et al. Cytologic effects of primary tooth endodontic filling materials. **Journal of Dental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 18–24, 2009.

ISO/INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 7405:2008 Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices. 2008.

ISO/INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. **International Organization for Standardization**, v. 3 Ed, p. 42, 2009.

JANG, D. S. et al. Constituents of *Musa paradisiaca* Cultivar with the Potential To Induce the Phase II Enzyme, Quinone Reductase - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). p. 6330–6334, 2002.

JESUS, D. DE. **Cytotoxicity and genotoxicity of Betula pendula Roth glycolic extract**. [s.l.] UNESP, 2016.

JESUS, S. C. DE et al. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. **Bragantia**, v. 63, n. 3, p. 315–323, 2004.

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

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

KALA, C. P. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 1, p. 11, 2005.

KAPADIA, S. P.; PUDAKALKATTI, P. S.; SHIVANAİKAR, S. Detection of antimicrobial activity of banana peel (*Musa paradisiaca* L.) on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 6, n. 4, p. 496–499, 2015.

KAUR, A. et al. Biototoxicity of commonly used root canal sealers: A meta-analysis. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 18, n. 2, p. 83, 2015.

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

LACATIVA, A. M.; LOYOLA, A. M.; SOUSA, C. J. A. Histological evaluation of bone

- response to pediatric endodontic pastes: An experimental study in guinea pig. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 635–644, 2012.
- LEE, J.-H. et al. Immunomodulatory/anti-inflammatory effect of ZOE-based dental materials. **Dental Materials**, p. 1–12, 2016.
- LEE, Y.-Y. et al. Eugenol modulates cyclooxygenase-2 expression through the activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts. **Journal of endodontia**, v. 33, n. 10, p. 1177–1182, 2007.
- LEONARDO, M. R. et al. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad Endod**, v. 102, n. 5, 2006.
- LEWIS, D.; FIELD, W.; SHAW, G. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca* L) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosion. **J Ethnopharmacol**, v. 65, n. 3, p. 283-8, 1999.
- LI, Z. et al. Cellular level biocompatibility and biosafety of ZnO nanowires. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 51, p. 20114–20117, 2008.
- LIN, L. M.; LIN, J.; ROSENBERG, P. A. One-appointment endodontic therapy: Biological considerations. **JADA**, v. 138, n. 11, p. 1456-62, 2007.
- LIMA, C. C. B. et al. Biocompatibility of root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 5, p. 405–416, 2015a.
- LIMA, S. M. D. F. et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in Vitro. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 7, p. 1061–1065, 2015b.
- LIMA, S. M. DE F. et al. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections - Biotechnological innovation in endodontics. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 203–213, 2015c.
- MACIEL, M. R. A.; GUARIM NETO, G. Um olhar sobre as benzedadeiras de Juruena (Mato Grosso, Brasil) e as plantas usadas para benzer e curar. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 1, n. 3, p. 61–77, 2006.
- MARTINS, F. O. et al. Atividade antiviral de *Musa acuminata* Colla, Musaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 781–784, 2009.
- MATHEW, N. S.; NEGI, P. S. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of wild banana (*Musa acuminata* Colla): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, n. December 2016, p. 124–140, 2017.
- MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S. DA; ANDREATA, R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítios da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 391–399, 2004.
- MONDAL, S. K. et al. Isolation, purification and some structural features of the mucilaginous exudate from *Musa paradisiaca*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 263–271, 2001.
- MOREIRA, R. S. **Banana: Teoria e Prática de Cultivo**. São Paulo: Fundação Cargill, 2ª Ed., 1999.
- MURAD, C.; FARINIUK, L. F.; FIDEL, S.; FIDEL, R. A. S.; SASSONE, L. M. Bacterial leakage in root canals filled with calcium hydroxide paste associated with different vehicles. **Braz Dent J**, v. 19, n. 3, 2008.

NELSON FILHO, P. et al. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 4, p. 303–311, 1999.

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

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; CHI, A. C. **Patologia oral e maxilofacial**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

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

OHYAMA, Y. et al. The polymethoxy flavonoid sudachitin suppresses inflammatory bone destruction by directly inhibiting osteoclastogenesis due to reduced ROS production and MAPK activation in osteoclast precursors. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018.

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

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

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. 2013. 103p.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Proposed 10-Year Regional Plan on the Oral Health for the Americas: Final Report**. 160th Session of the Executive Committee. June 2017.

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

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

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

PAWIŃSKA, M. et al. Assessment of cytotoxic potential of root canal sealers after hardening – an ex vivo study. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 69, p. 503–509, 2015

PILOWNIC, K. J. et al. Antibiofilm Activity of Five Different Endodontic Filling Materials Used in Primary Teeth Using Confocal Laser Scanning Microscopy. **Pediatric dentistry**, v. 39, n. 2, p. 145–149, 2017.

PIRES, C. W. et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 8, p. 737–745, 2016.

PIZZAIA, D. **Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

QUEIROZ, A. M. DE et al. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: Zinc Oxide and Eugenol Cement, calen paste thickened with Zinc Oxide, Sealapex and EndoREZ. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 4, p. 290–296, 2009.

- QUEIROZ, A. M. DE et al. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 3, p. 203–211, 2011.
- RAMAR, K.; MUNGARA, J. Clinical and radiographic evaluation of pulpectomies using three root canal filling materials: an *in vivo* study. **J Indian Soc Pedod Prevent Dent**, v. 28, n. 1, 2010.
- REDDY, K. M. et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Applied Physics Letters**, v. 90, n. 21, p. 10–13, 2007.
- RICUCCI, D. et al. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: Results after 5 years. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 112, n. 6, p. 825–842, 2011.
- SANTOS, N. C. N. et al. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of filling pastes used for pulp therapy on deciduous teeth using the micronucleus test on bone marrow from mice (*Mus musculus*). **Mutagenesis**, v. 31, n. 5, p. 589–595, 2016.
- SARIGOL, C. G. et al. Cytotoxic effects of primary tooth root canal filling materials on L929 cell line. **Journal of Dentistry for Children**, v. 77, n. 2, p. 72–76, 2010.
- SCELZA, M. Z. et al. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 1, p. 12–18, 2012.
- SHARMA, K. S.; PORWAL, K. M.; METHA, B. K. In vitro antimicrobial activity of *Musa paradisiaca* root extracts. **Fitoterapia**, v. LX, p. 157–8, 1989.
- SILVA, L. A. B. DA. **Clinical Protocols: endodontic treatment in deciduous teeth**. 1. ed. Ribeirão Preto: FORP-USP, 2015.
- SILVA, G. O. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 4, p. 815–819, 2016.
- SILVA, L. A. B. et al. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 1, p. 38–45, 2010.
- SILVA, M. B. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de Musa paradisiaca frente a Enterococcus faecalis**. [s.l.] Amazonas Federal University, 2011.
- SILVA, M. B. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic pastes made of *Musa paradisiaca* glycolic extract over *Enterococcus faecalis*. **Full Dentistry in Science**, v. 4, n. 14, p. 352–357, 2013.
- SILVA, M. B. **Extrato Glicólico de Banana (Musa paradisiaca) para a Endodontia de decíduos e permanentes**. 1. ed. [s.l.] editora CRV, 2018.
- SOARES, C. D. et al. *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 812–818, 2015.
- SRIVASTAVA, S.; BANKAR, R.; ROY, P. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8–9, p. 683–690, 2013.
- SUNZEL, B. et al. The protective effect of zinc on rosin and resin acid toxicity in human polymorphonuclear leukocytes and human gingival fibroblasts in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 37, n. 1, p. 20–28, 1997.
- SWANSON, M. D. et al. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication.

Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 12, p. 8646–8655, 2010.

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

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

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

VIJAYAKUMAR, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia**, v. 79, n. 4, p. 279–282, 2008.

WANG, B. et al. Toxicity of ZnO Nanoparticles to Macrophages Due to Cell Uptake and Intracellular Release of Zinc Ions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 8, p. 5688–5696, 2014.

WANG, H. et al. Fluorescent dye encapsulated ZnO particles with cell-specific toxicity for potential use in biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 11–22, 2009.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1–7, 2015.

YANG, C.-P. et al. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa Sapientum* L.) Pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2732–2735, 2000.

ZHANG, Y. et al. Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1633–1645, 2013.

9. ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA	
- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
<p>Título da Pesquisa: Avaliação da Biocompatibilidade de Pastas Endodônticas</p> <p>Pesquisador Responsável: MAURICIO BACARIN SILVA</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 1</p> <p>CAAE: 55232216.2.0000.5016</p> <p>Submetido em: 14/04/2016</p> <p>Instituição Proponente: Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas/UEA</p> <p>Situação da Versão do Projeto: Aprovado</p> <p>Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>	
	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_692659	

ANEXO B: Cadastro no SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A1BA9CA

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A1BA9CA**
 Usuário: **Mauricio Bacarin Silva**
 CPF/CNPJ: **271.768.548-07**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Musa paradisiaca
 banana: fruto da bananeira

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e da biocompatibilidade de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de Musa paradisiaca e de suas características químicas**

Equipe

Mauricio Bacarin Silva	ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Angela Delfina Bittencourt Garrido	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Data do Cadastro: **07/11/2017 08:05:17**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 8:06 de 07/11/2017.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO C: Certificado de Análise do EGB - MAPRIC®


CERTIFICADO DE ANÁLISE
EXT. GLIC. BANANA 20LT

OP: 019569
 Fabricação: 20/04/16
 Origem: Brasil
 Nomenclatura INCI: Musa Paradisica Fruit Extract
 Planta utilizada: Musa Paradisica

Lote: PROD019569
 Validade: 20/04/19
 Procedencia: Brasil
 No CAS: N.A
 Parte utilizada: Fruto

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm ³)	Entre 1,000 e 1,100	1,003
pH (sol a 10%)	Entre 4,00 e 6,00	5,37
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total de bactérias	Máx 100 UFC / g	< 10
Cor	Incolor a levemente amarelado	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em etanol, propilenoglicol, glicerina, sorbitol e água.	De acordo

Monografia: METODOLOGIA INTERNA

Armazenamento: ACONDICIONAR EM RECIPIENTE HERMÉTICO, AO ABRIGO DE CALOR E DE LUZ SOLAR DIRETA. COM O TEMPO PODE SOFRER TURVAÇÃO e/ou precipitação.

OBS: ** Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP-14.851

Ana Carolina Massarani Ramos
 Farmacêutica
 CRF- SP 35.022

25/04/16

Departamento técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br