



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA**

**Citotoxicidade e Alterações de cor em dentes humanos de Soluções
Fitoterápicas da Amazônia**

Bolsista: Geisy Rebouças Lima, CNPq

**MANAUS
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL
PIB-S/042/2010**

**Citotoxicidade e Alterações de cor em dentes humanos de Soluções
Fitoterápicas da Amazônia**

Orientadora: _____
Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

Bolsista: _____
Geisy Rebouças Lima - CNPq

**MANAUS
2011**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: dente posicionado na cortadeira com disco de diamante	34
Figura 02: secção a cora da raiz do dente.....	34
Figura 03: espectrofotômetro. Fonte: http://www.wilcos.com.br/vita_easyshade_compact.php acesso: 14/07/2011.....	36
Figura 04: diagram do Espaço de cor CIELAB. Fonte: < www.cielab.com.au > acesso: 14/07/2011.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10, 30 segundos e 10 minutos das soluções testes em dentes humanos.....	43
--	----

Lista de Gráficos

Gráfico 01 –Percentagem da viabilidade celular das emulsões de copaíba.....	38
Gráfico 02 - Percentagem da viabilidade celular da suspensão do extrato aquoso de própolis a 1%.....	39
Gráfico 03 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 segundos das soluções testes em dentes humanos	40
Gráfico 04 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 30 segundos das soluções testes em dentes humanos.....	41
Gráfico 05 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 minutos das soluções testes em dentes humanos.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

A. mellifera – *Apis mellifera*

C.krusei- *Candida krusei*

C.albicans- *Candida albicans*

C.tropicallis- *Candida tropicallis*

C. guilhermodii – *Candida guilhermondii*

B.dracunculioflia - *Baccharis dracunculioflia*

D. ecastophyllum - *Dalbergia ecastophyllum*

E. aerogeneses - *Enterobacter aerogeneses*

E.faecallis - *Enterococcus faecallis*

E. coli- *Echerichia coli*

P.aeruginosa- *Pseudomonas aeruginosa*

P. lineata - *Phelsuma lineata*

S.aureus- *Staphylococcus aureus*

S.epidermis- *Staphylococcus epidermis*

S. mutans- *Streptococcus mutans*

S. sanguinis- *Streptococcus sanguinis*.

S.sobrinus- *Streptococcus sobrinus*

S. typhimurium- *Salmonela typhimurium*

CM – copaíba

P – extrato aquoso de própolis

CIM- Concentração Inibitória Mínima

A – produto biotecnológico oriundo da biodiversidade amazônica

SUMÁRIO

RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Modelo de estudo.....	30
4.2 Considerações éticas.....	30
4.3 Critérios de inclusão.....	30
4.4 Critérios de exclusão.....	33
4.5 Benefícios	33
4.6 Riscos	33
4.7 Avaliação Atividade Hemolítica em eritrócitos humanos	33
4.8 Teste de Cultura de Células	34
4.9 Influência do tempo de aplicação das soluções testes na cor dos dentes humanos.....	35
4.9.1 Confeção dos corpos de prova.....	35
4.9.2 Imersão dos corpos de prova na solução teste	37
4.9.3 Leitura de cor.....	37
4.9.4 Análise Estatística	38

5.RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	51
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	52
9 REFERÊNCIAS.....	55

RESUMO

Os testes de biocompatibilidade envolvendo a aplicabilidade de um produto são importantes para definir a viabilidade de utilização como agente de limpeza de cavidades durante um procedimento restaurador, que visa remover os resíduos que podem prejudicar a adaptação e o vedamento marginal, reduzindo quantitativamente os microrganismos e seus produtos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a citotoxicidade e a alteração de cor dos dentes humanos de acordo com o tempo de aplicação das emulsões e suspensões formuladas com o óleo de copaíba e extrato aquoso de própolis. No teste de hemólise utilizou-se uma suspensão de eritrócitos. O sobrenadante, após a centrifugação, foi removido e a hemoglobina liberada foi medida com auxílio de espectrofotômetro. No teste de cultura de células foram utilizados fibroblastos murinos e o sinal fluorescente gerado foi proporcional ao número de células viáveis. Para o teste de alteração de cor, foram utilizados 180 corpos de prova de dentes humanos, distribuídos em 6 grupos experimentais: G1- copaíba 10%; G2- copaíba 30%; G3- copaíba 10% + A; G4- copaíba 30% + A; G5- extrato de própolis 1%; G6- clorexidina a 2%. Foi realizada a leitura prévia e após a imersão nas soluções durante 10 segundos, 30 segundos ou 10 minutos de acordo com os grupos experimentais, com auxílio de espectrofotômetro com parâmetros do sistema CIE lab ($L^* a^* b^*$). Nos resultados do teste de alteração de cor foi utilizado o *Kruskal-Wallis* para comparação nos diferentes grupos e *Mann-Whitney* para a comparação de duas medianas ($p=0,006$). Todas as substâncias testes apresentaram toxicidade nos testes empregados, excetuando a suspensão de própolis no teste de hemólise. O teste de cor demonstrou que o tempo de aplicação pode interferir na alteração de cor dos dentes humanos e que a própolis apresentou melhor resultado independente do período experimental.

Palavras-chave: cárie dentária, fitoterápicos, citotoxicidade, espectrofotometria.

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é reconhecida como uma doença infecciosa e transmissível aos tecidos calcificados dos dentes, resultando em uma perda localizada dos tecidos duros. É considerada multifatorial, que depende da interação fatores: o hospedeiro, representado pelos dentes e saliva, a microbiota, a dieta consumida e o fator tempo (JORGE, 2007). Além dos fatores biológicos, comportamentais e sócio-econômicos influenciam na susceptibilidade do desenvolvimento da lesão cárie, como a má distribuição da renda, a falta de participação na riqueza nacional, o desemprego, o atraso tecnológico em alguns setores e os elevados índices de analfabetismo (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

O preparo cavitário é o tratamento dado ao elemento dental anteriormente ao recebimento do material restaurador que durante esse preparo se acumulam raspas de dentina e esmalte, microrganismos, restos celulares e sangue, podendo interferir com a adaptação dos materiais restauradores (PEREIRA et al., 1998).

Black foi quem idealizou uma seqüência lógica de procedimentos para o preparo da cavidade restauradora, e o último procedimento a ser realizado é a limpeza cavitária, possibilitando a colocação do material restaurador em uma cavidade completamente limpa melhorando a adaptação e o vedamento marginal da restauração (RODE e SANTOS, 1990).

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é descrita desde os primórdios da civilização (DI STASI, 1996). As Copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e África Ocidental (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). Os trabalhos realizados sobre o Gênero da *Copaifera*, em sua maioria, estão relacionados com as suas propriedades químicas e farmacológicas do óleo secretado do tronco dessas árvores (VALDEVITE, 2007).

O emprego da própolis já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios, tendo sido classificada por Aristóteles como um eficiente preventivo contra infecções no tratamento de abscessos e feridas (GERALDINI et al., 2000; PEREIRA et al., 2002). A própolis possui função biológica bactericida, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK et al., 2002 *apud* GHISALBERTI, 1979; BANKOVA et al., 1989; PARK et al., 1998; PARK et al., 2000).

Tendo em vista que a copaíba (*Copaifera Multijuga*) e extrato aquoso de própolis (CM e P, respectivamente) são produtos da biodiversidade amazônica que cada vez mais atrai interesse, devido as ações antiinflamatória, antiséptica, antibacteriana e antifúngica, mostra-se interessante formular um agente de limpeza de cavidade a base de copaíba e própolis como uma alternativa de produto de assepsia de uso odontológico.

Diante da importância dos testes de compatibilidade biológica e da possibilidade de utilizar como agente de limpeza cavitária propõe-se analisar a citotoxicidade de uma emulsão a base do óleo de *Copaifera multijuga* e de uma suspensão de extrato aquoso de própolis e observar a influência do tempo de aplicação destes produtos experimentais na alteração de cor dos dentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a citotoxicidade e a alteração de cor em dentes humanas de acordo com o tempo de aplicação das emulsões a base do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e suspensão de extrato aquoso de própolis.

2.2 Específicos

- Analisar a toxicidade das emulsões de copaíba e suspensão de própolis através do teste de Hemólise e de Cultura de células.
- Verificar alterações de cor em dentes humanos extraídos após a imersão em emulsões de copaíba e suspensão de própolis em diferentes tempos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Limpeza de cavidade

Mondelli (2006) preconiza a necessidade do preparo cavitário, pois é esse tratamento biomecânico da doença cárie e de outras lesões dos tecidos duros do dente que tornam as estruturas remanescentes aptas a receber uma restauração que seja resistente, proteja e previna a reincidência de cárie.

Segundo Black o último princípio a ser observado em um preparo cavitário é a limpeza da cavidade que visa remover, com eficácia, a maioria dos resíduos que podem prejudicar a adaptação da restauração impedindo a infiltração marginal, além de reduzir quantitativamente os microrganismos (Rode e Santos,1990).

Quando a restauração é adesiva torna-se indispensável o uso de um agente desmineralizante como agente de limpeza de cavidade restauradora, o ácido fosfórico 37%, promovendo a completa remoção da lama dentinária, permitindo assim uma melhor penetração do sistema adesivo nos túbulos dentinários. Este tipo de restauração adesiva tem possibilitado a manutenção de estruturas frágeis, as quais podem ser reforçadas; logo, a lavagem da cavidade com agentes não-desmineralizantes tem sido indicada mais para torná-la asséptica do que para a remoção de resíduos. Os principais agentes não-desmineralizantes utilizados na prática diária são os germicidas, à base de clorexidina, e os alcalinizantes, à base de hidróxido de cálcio (BUSATO, 2002).

A clorexidina é uma bisguanida catiônica com ampla atividade antimicrobiana. Os produtos de higiene oral com clorexidina são os agentes mais efetivos em termos de duração e espectro de ação. Agem causando dano à membrana citoplasmática, levando à lise celular das bactérias, sendo bacteriostáticos ou bactericidas. Possuem afinidade por grande variedade de

substratos e persistem nas superfícies bucais devido à sua alta substantividade (HERRERA et al, 2003).

Araújo et al (1998) verificaram a atuação de diversas substâncias para limpeza dentinária através de microscopia eletônica de varredura (MEV). Para sua realização foram utilizados dentes humanos seccionados e desgastados para obtenção da lama dentinária. Diante disso, foram divididos em grupos para análise das seguintes substâncias: "spray" ar/água (controle); jato óxido de alumínio m; ácido fosfórico a 10%; ácido poliacrílico a 25%; flúor fosfato acidulado a 1,27%; fluoreto de sódio neutro a 2%; água oxigenada a 3%; associação alternada de Dakin/Tergensol; todos seguidos de lavagem e secagem, com exceção do grupo controle. Os espécimes foram analisados em MEV. As substâncias mais eficientes na remoção da lama dentinária em ordem decrescente foram: ácido fosfórico 10%; ácido poliacrílico 25%; flúor fosfato acidulado 1,27%; jato de óxido de alumínio 50 m; água oxigenada 3%; associação alternada de Dakin/Tergensol; fluoreto de sódio 2%; "spray" ar/água.

3.2 Copaíba

Yunes & Cechinel Filho (2001) relataram que a copaíba (*Copaifera multijuga*), ou copaibeira é uma árvore de grande porte da família Leguminosae encontrada em todo o Brasil. O gênero *Copaifera* possui mais de 25 espécies, sendo a maioria encontrada na América do Sul. Árvore mede até 36 metros de altura possui copa densa, casca lisa e fruste reto; produz de 2 a 3 kg de sementes.

Ferreira (1999), em revisão de literatura, estudou que pela observação do comportamento de certos animais quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaibeiras, então, os índios passaram a utilizar a copaíba principalmente como cicatrizante e no umbigo de recém-nascidos

para evitar o mal-dos-sete-dias. Os guerreiros quando voltavam de suas lutas untavam o corpo com o óleo da copaíba e se deitavam sobre esteiras suspensas e aquecidas para curar eventuais ferimentos.

Veiga Junior et al (2001) relataram que a espécie *Copaifera multijuga* Hayne pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Ocorre desde o médio Tapajós até a Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia).

Leite (2001) mostrou que a *Copaifera multijuga* Hayne é uma árvore grande, podendo chegar a 36 metros de altura, de copa densa e casca lisa (0,5 cm - 2,0 cm de espessura), fuste reto (diâmetro entre 40 a 50 cm), diferenciando-se das espécies do mesmo gênero pelas flores maiores, brancas e pelo tamanho dos folíolos e dos frutos.

3.2.1 COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Segundo Soares et al (2003) os óleos de copaíba são misturas de sesquiterpenos e diterpenos. O ácido copálico e os sesquiterpenos β -cariofileno e o α -copaeno são os principais componentes do óleo.

Segundo Bandeira et al (1999b), o óleo resina de CM apresenta em sua composição vários sesquiterpenos, principalmente β -cariofileno, α -humuleno, cedreno, cadineno e bisaboleno.

Plowden (2003) mostrou que as características físico-químicas do óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne é um líquido transparente, viscoso e fluido, com cheiro forte e odor de cumarina, sabor acre e amargo. Pode ser armazenado por até 2 anos sem alterar as suas propriedades podendo transformar-se em resina se exposto ao ar e à luz.

3.3 Própolis

3.3.1 COMPOSIÇÃO

Ghisalberti et al (1979) em revisão bibliográfica relataram que os principais componentes encontrados na própolis pertenciam ao grupo dos flavonóides, de origem botânica. Os autores descreveram que os flavonóides isolados da própolis correlacionavam razoavelmente com os presentes na flora nas quais as abelhas visitavam.

Park et al (2002) analisaram a própolis produzida por abelhas *Apis mellifera* no sul do Brasil, Argentina e Uruguai através de técnicas cromatográficas. Relataram que a composição da própolis depende da época, vegetação e área da coleta. Após os resultados obtidos por CCDAE-FR, CLAE-FR E GG-EM, as própolis obtidas do Sul do Brasil foram classificadas em 5 grupos distintos. Com base nas evidências fitoquímicas, *Papulus nalba* foi identificada como a principal fonte da própolis do grupo 3 do Sul do Brasil, Argentina e Uruguai.

Alencar et al (2005) realizaram análises fitoquímicas de própolis produzida através *B. dracunculifolia* (alecrim-do-campo) por abelha *Apis mellifera*, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e gasosa com espectrometria de massas. Os autores relataram que uma característica dos compostos fenólicos das própolis analisadas e da espécie vegetal *B. dracunculifolia* foi à alta proporção de artepilin C e potros derivados do ácido cinâmico. Com base em suas análises concluíram que a espécie vegetal de *B. dracunculifolia* é a principal fonte de resina para a elaboração das própolis produzidas nos estados de Minas Gerais e São Paulo.

Meneses (2005) em uma revisão bibliográfica relatou que os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento foram: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos ésteres aromáticos, açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas,

charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonóides, flavonas e flavononas), Terpenóides, Proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais.

Daugusch et al (2007) analisaram a própolis vermelha e sua origem botânica através de amostras coletadas nos manguezais dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. As abelhas foram observadas coletando exsudado resinoso vermelho de *Dalbergia ecastophyllum* (família *Leguminosae-Papilionatae*) para produção de própolis. Os métodos cromatográficos utilizados para analisar os flavonóides da própolis e da resina vermelha foram CLAE-FR e CCDAE-FR. Portanto, segundo os autores a origem botânica da própolis vermelha é a *D. ecastophyllum* e quando é coletada exclusivamente desta planta apresenta atividade antimicrobiana maior que a misturada de outras plantas. Nas áreas onde a *D. ecastophyllum* foi rara ou não estava presente, as abelhas coletavam de outras plantas.

Ishida et al (2011) avaliaram própolis da região Amazônica para analisar a composição de extratos de etanólico de própolis. Foram analisados por HPLC / DAD / ESI-MS / MS e GC / EIMS as amostras do extratos de etanólico de própolis (E1-E4). Os componentes principais de E2 e E4 são benzofenonas poliprenilados: 7 - epi-nemorosone, 7 - epi-clusianone (principais constituintes E4), xantochimol e gambogone (principais constituintes E2), formando um perfil químico, até agora não declarada de própolis brasileira. Os extratos E2 e E4 foram altamente ativa contra a bactéria cariogênica *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*.

3.3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Azevedo et al (1986) avaliaram a atividade bactericida e bacteriostática da própolis concentrada a 3% em tratamento das escaras de decúbito e observaram que o medicamento

ativou consideravelmente a regeneração dos tecidos, reduzindo o tempo e o custo usuais para tratamento clássico das lesões.

Woisky, Giesbrecht e Salatino et al (1994) apresentaram resultados de testes *in vitro* de inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, realizados com uma formulação que contém extrato de própolis, óleos essenciais, sacarose e glicose. Afirmaram que a ação antibacteriana observada é devida exclusivamente aos componentes da própolis, não atribuindo qualquer participação aos componentes dos óleos essenciais.

Fernandes Jr. et al (1995) estudaram a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* isolados das infecções humanas. Entre os microrganismos estudados os mais susceptíveis a própolis foram *S. aureus*, *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Gebara et al (1996) avaliaram a ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Os autores afirmaram que já existe no mercado, substância eficiente na prevenção da cárie, a clorexidina, mas devidos aos seus efeitos colaterais, a mesma não pode ser usada por um longo tempo. Com isto a procura por substância “ideal” continua. As substâncias testadas foram: cacau, tominho, salva, malva e a própolis. O tominho, o cacau e a própolis apresentaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos testados, já as tinturas de salva, malva e camomila não apresentaram a mesma atividade. Na análise de inibição do *S. mutans* e *S. sobrinus*, a própolis apresentou resultado efetivo em menor concentração, 0,01 mg/mL. Esses resultados sugerem a possibilidade do uso dessas substâncias no controle das bactérias presentes no biofilme dental.

Park et al (1998) obtiveram extratos etanólicos de própolis utilizando água e diferentes concentrações de etanol como solventes. Esses extratos foram analisados quanto ao seu espectro de absorção por espectrofotometria na região ultravioleta, por cromatografia em camada delgada de alta performace e por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE). O pico de absorção máxima de todos os extratos foi a 290 nm sendo o extrato etanólico a 80% o que apresentou maior absorção. A maioria dos flavonóides foram extraídos nas concentrações alcóolica entre 60 a 80%. Foram testados ainda o efeito antimicrobiano, antioxidante e anflinflatório desses extratos. Verificou-se que os extratos etanólicos de própolis entre 60 a 80% inibiram satisfatoriamente o crescimento microbiano e os extratos etanólicos a 70 e 80% apresentaram grande atividade antioxidante, e ainda, o extrato etanólico a 80% foi a que melhor resultado apresentou sobre a inibição da atividade da enzima hialuronidase.

Bianchini e Bedendo (1998) avaliaram o efeito antibiótico do extrato aquoso de própolis, em várias concentrações em cinco espécies de bactérias fitopatogênicas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia chrysantheni*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Os resultados mostraram que *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foram completamente inibidas em meio de cultura contendo 10% de extrato de própolis, a *Erwinia chrysantheni* foi parcialmente inibida, enquanto *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* mostrou-se insensível ao extrato. Resultados idênticos foram observados quando própolis foi incorporado ao meio antes e após a autoclavagem, mostrando que a substância ativa no extrato não é fotossensível, com isso os autores concluíram que a própolis possui atividade antibacteriana frente a bactérias fitopatogênicas.

Fernandes Jr. et al (2001) investigaram a atividade antibacteriana da própolis produzida por *Apis mellifera* e abelhas brasileiras sem ferrão chamado “meliponíneos”. Testes de susceptibilidade ao extrato etanólico da própolis foi realizado contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp, e *Escherichia coli*, isolados de infecções humanas. As espécies de abelhas utilizadas foram *Nannotrigona testaceicornis* ("Iraí"), *Tetragonisca angustula* ("Jataí"), *Trigona spinipes* ("Arapuá"), *Scaptotrigona* sp ("Tiúba"), *Partamona* sp ("Cupira"), *Melipona scutellaris* ("Uruçu"), *Melipona* sp ("Manduri"), e *Melipona mandaçaia* ("Mandaçaia"). Os resultados demonstraram que a própolis produzida por “Cupira” e “manduri” apresentaram maior atividade antibacteriana do que a *A. mellifera*.

Pinto et al (2001) relataram que o extrato etanólico de própolis comercial, os extratos etanólico e, em menor proporção, o metanólico inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae* do leite de vacas com mastite, exercendo seu efeito antibacteriano.

Vargas et al. (2004) avaliaram a ação antibacteriana da própolis através da inoculação de placas de ágar BHI contendo 5% de extrato alcoólico de própolis a 50% em solução de álcool etílico 96°GL, com inóculo bacteriano de 1×10^6 células.mL⁻¹. O extrato alcoólico de própolis a 50% avaliado foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a maioria dos isolados testados, inibindo o crescimento de 67,70% das amostras de *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosas* avaliadas. As bactérias Gram-positivas mostraram-se mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado do que as Gram-negativas (42,5%). Dentre as bactérias avaliadas, *Nocardia asteroides* foi a Gram-positiva mais sensível (100%) e

Pseudomonas aeruginosa a Gram-negativa que apresentou maior sensibilidade (72,41%) ao extrato de própolis.

Andréa, Costa e Clarton (2005) em uma revisão bibliográfica citaram que a própolis possui atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antiprotozoária, anticancerígena, antifúngica, ação antioxidante e efeitos anestésicos.

Grégio et al.(2005) analisaram a capacidade da própolis no processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos, utilizando 60 ratos wistar divididos em dois grupos: o controle que receberam aplicações tópicas de soro fisiológico e o tratado que receberam aplicações tópicas do extrato alcoólico de própolis. Os grupos foram separados em grupos de 6 animais para avaliação nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 42 dias. As lesões ulceradas foram induzidas quimicamente pela aplicação diária de hidróxido de sódio 40% na mucosa que reveste a língua de cada animal. Após a constatação da formação da lesão os grupos receberam os materiais e foram esperados cada período experimental. Os autores concluíram que o extrato alcoólico da própolis promoveu uma aceleração nos fenômenos relacionados à cicatrização.

Uzel et al. (2005) analisaram a atividade antibacteriana de quatro amostras de extratos etanólicos de própolis (EEP) de diferentes regiões. Os microrganismos testados foram: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. faecalis*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*. Todas as amostras mostraram atividade antimicrobiana. Os principais componentes das amostras das própolis foram os flavonóides. Todas as amostras estudadas continham flavonóides similares, mas componentes individuais foram detectados, isto pode explicar a diferença na concentração final nos testes CIMs.

Almeida et al. (2006) avaliaram a ação de uma solução anti-séptica do extrato de própolis sobre os índices clínicos e contagem de *S. mutans*. A atividade antimicrobiana do extrato foi

realizada em meio de cultura sólida para determinar a CIM utilizando cepas de *S. mutans*. A partir da CIM do extrato foi confeccionada uma solução para bochecho de própolis (6,25%), a qual foi utilizada como solução teste e comparada com um controle positivo clorexidina (0,12%). Os resultados demonstraram significativa redução do número de *S. mutans* após o uso da solução de própolis não diferindo da solução de clorexidina. A solução do extrato de própolis apresentou satisfatória atividade antimicrobiana e ação semelhante a clorexidina, além de atuar sobre condições clínicas como a presença do biofilme oral e doença gengival, podendo ser empregado como agente terapêutico.

Longhini et al (2007) observaram a atividade antifúngica de extratos alcoólicos e glicólicos de própolis através da determinação da concentração inibitória mínima utilizando como base o método de microdiluição em caldo. Para o teste foram utilizadas 67 leveduras de interesse médico isoladas de casos clínicos de onicomicoses de pacientes atendidos no Laboratório de Pesquisa em Análises Clínicas e a *Candida Albicans* que foi o controle. Os autores concluíram que tanto os extratos alcoólicos quanto o glicólicos mostraram atividade antifúngica, sendo os extratos alcoólicos mais eficiente do que os glicólicos.

3.4 Testes de Compatibilidade Biológica

Os testes de biocompatibilidade são regulamentados pela FDI/ADA, com objetivo de evitar ou minimizar desperdício e tempo consumido no experimento clínico, atingindo não somente a economia, eficiência e trabalho, mas eliminar a possibilidade de efeitos a longo prazo de determinadas substâncias locais ou sistemicamente no homem. Estes testes compreendem três níveis: testes iniciais que avaliam a toxicidade geral; testes secundários que analisam a toxicidade local do tecido, e o *Usage test* que é realizado em animais ou em seres humanos reproduzindo a aplicação clínica de tais materiais (ISO/Technical Report 7405).

AFDI e a ADA têm colaborado nos últimos anos para criar aceitação mundial de padronização e especificações para os materiais odontológicos. A maioria dos fabricantes sérios têm seguido essas recomendações, no entanto, há necessidade de padronização dos testes similar aos das propriedades físicas e químicas dos materiais, para avaliação das propriedades biológicas. Todos os fabricantes e seus fornecedores devem produzir materiais que proporcionem segurança e eficiência. É desnecessário dizer que deve-se criar urgentemente testes padrões para aceitação biológica de materiais (ISO/Technical Report 7405).

Estudos adicionais têm sido realizados para aperfeiçoar os testes “in vivo”. O desenvolvimento aperfeiçoado dos testes “in vitro” têm fornecido melhor correlação com a situação “in vivo” e têm recebido considerável atenção. Importante passo para o consenso internacional sobre os métodos de testes foi apresentado pela FDI e ADA, fornecendo recomendações práticas padronizadas para testes biológicos de materiais dentários (ISO/Technical Report 7405).

Autian (1974) relatou que a toxicidade inerente dos materiais tem implicação de risco à saúde do homem, somente se as condições de contato permitir que os efeitos tóxicos sejam realizados, além disso, igual benefício pode ser de baixo ou alto grau de toxicidade, assim o risco benefício deve ser avaliado. Toxicidade são injúrias a efeitos químicos e forças físicas sobre sistemas biológicos. Também avaliou os materiais odontológicos em três níveis de testes: Nível I: abrange uma série de testes pré-clínicos, estudos em animais e sistemas “in vitro”; Nível II: “In use” teste em animais com material a ser usado. Este teste procede duplicação do processo para ser usado quando o material for aplicado em pacientes; Nível III: realizados em humanos, após a realização dos nível I e II e comprovação da baixa toxicidade do material.

3.5 Toxicidade Geral ou Citotoxicidade

3.5.1 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Pequeno e Soto-Blanco (2006), avaliaram a eficácia do teste de ação hemolítica in vitro para avaliação preliminar da toxicidade de plantas tóxicas usando espécies de toxicidade conhecida (*Crotalaria retusa*, *Ipomoea asarifolia*, *Ipomoea fistulosa*, *Datura stramonium*, *Nerium oleander*, *Ricinus communis*, *Lantana camara*, *Dieffenbachia picta* e *Alocacia* sp. e *Calotropis procera*). Todas as espécies foram submetidas ao teste de atividade hemolítica utilizando uma suspensão de equino e nenhuma planta apresentou hemólise, concluíram que a utilização do teste de hemólise é ineficaz para avaliação preliminar de plantas tóxicas.

Pêssoa et al (2007) , avaliaram a toxicidade aguda e os efeitos citotóxico e esposmolítico dos liófilos de *Pomacia lineata* e de sua desova. Um dos testes utilizado para a avaliação do efeito citotóxico foi o da atividade hemolítica em eritrócitos isolados em ratos, nos quais os eritrócitos sedimentados foram resuspensos em 0,5 mL de solução de Crebs. Os liófilos de *P. lineata* e de sua desova foram adicionados em preparações de diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 mg/ mL e posteriormente incubados por 1 hora sob agitação constante. As suspensões foram centrifugadas a 500 rpm por min. Concluíram que os liófilos de *P. lineata* e de sua desova não apresentavam atividade hemolítica até a concentração de 1000 mg/mL.

3.6 Teste de Cultura de Células

Cruz et al (1998) compararam a sensibilidade do método de difusão em ágar e do método de extração utilizando as linhagens celulares RC-IAL (células fibroblásticas de rim de coelho) e HeLa (células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano), na avaliação da citotoxicidade

in vitro de materiais de uso médico-hospitalar. Houve diferenças favoráveis ao método de difusão em ágar em duas concentrações, isto é, a sensibilidade deste método foi significativamente maior, por inspeção, em relação ao método de extração, além de se constituir em método mais simples de ser realizado.

Rogero et al. (2003) avaliaram *in vitro* a biocompatibilidade de diferentes tipos de biomateriais. Realizaram o teste de citotoxicidade em cultivo de células de tecido conectivo de camundongos, NCTC Clone 929 da American Type Culture Collection. O estudo comparativo do ensaio de citotoxicidade foi realizado com duas metodologias: 1) ensaio de difusão em ágar e 2) ensaio de incorporação do vermelho neutro. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as metodologias podem ser utilizadas, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada.

3.7 Alteração Cromática

Fondriest (2003) apresentou a classificação tridimensional de cor descrita por Albert Munsell. As três dimensões são Matiz (Hue), Brilho (Brightness), e Saturação (Chroma). Matiz é a qualidade que distingue uma família de cores da outra. É especificada como o comprimento de onda de luz dominante mesmo que a cor em si não possa ser distinguida. O brilho é a quantidade de luz que retorna do objeto, sendo descrito como a escala do branco para o preto. A saturação é a intensidade da matiz.

Em revisão de literatura, Joiner (2004) afirmou que o fenômeno da cor é uma resposta psicofísica para a interação física da energia de luz com um objeto, e uma experiência subjetiva de um observador individual. A cor de um dente é determinada pela combinação de propriedades ópticas. Quando a luz encontra um dente, quatro fenômenos associados com a interação do fluxo de luz e do dente podem ser descritos, a transmissão especular da luz através do dente, reflexão

especular de luz na superfície, reflexão difusa de luz na superfície e absorção e dispersão de luz dentro dos tecidos dentais.

Caneppele et al (2009) avaliaram *in vitro* o clareamento dental com peróxido de carbamida (PC) 16% em dentes submetidos à embebição em substâncias com corantes durante o tratamento. Foram utilizados 40 incisivos bovinos, divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento: G1, G2, G3 e G4 – clareamento com PC 16% 8 horas/dia durante 14 dias. Com espectrofotômetro clínico foram medidas as coordenadas de cor $L^*a^*b^*$ dos dentes, antes e após os tratamentos (1º e 14º dias). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste t de Student, ANOVA e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), e mostraram diferenças estatísticas entre as situações iniciais e finais, para todas as coordenadas em cada condição experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos que sofreram clareamento e embebição nos corantes (2, 3 e 4) e o grupo submetido somente ao clareamento (1 - controle). Concluiu-se que a embebição dos dentes em soluções com corantes não afetou o resultado do tratamento clareador.

Cardoso et al (2007) avaliaram *in vitro*, influência do tempo de aplicação do peróxido de carbamida à 10% no resultado da cor dos dentes, através do espectrofotômetro. Trinta pré-molares extraídos foram envolvidos neste estudo, divididos aleatoriamente em 3 grupos. O tempo de aplicação diário do agente clareador variou em: GI- 1h; GII- 2h e GIII- 8h. A determinação da cor dos espécimes foi realizada antes e após o tratamento clareador através espectrofotômetro (VITA Easyshade 2, Vident, Brea, CA, USA). Após o teste ANOVA, observou-se que não houve diferença estatística para a variável tempo de aplicação nas coordenadas L^* , a^* , b^* e ΔE . Concluiu-se que o tempo de aplicação de 8h deve ser substituído pelo de 1h ou 2h, pela similaridade na mudança de cor dos 3 grupos.

Alma-Dozi et al (2007) avaliaram a eficácia e precisão de cinco dispositivos padronizados para medição de cor em dentes comercialmente disponíveis em ambientes clínicos. Em um estudo in vitro, as guias (A1, A2, A3, A3.5, A4 e escala de Vita Lumin) foram medidos cinco vezes com cinco dispositivos eletrônicos (ShadeScan, Easyshade, Ikam, IdentaColor II, e ShadeEye) por dois operadores. Em um estudo in vivo, os dentes incisivos centrais superiores de 25 estudantes de odontologia foram medidos com os mesmos dispositivos eletrônicos por um único operador. Os resultados foram expressos como CIE lab (valores e em termos de precisão e exatidão das diferenças de cor ΔE). No teste in vitro foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney, e no teste in vivo, o teste de Kruskal-Wallis. Não houve diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os diferentes operadores na em estudo in vitro. A precisão obtida foi em ordem decrescente foi Easyshade, ShadeScan, Ikam, IdentaColor, ShadeEye.

Lindsey, Wee (2007) determinaram a perceptibilidade e aceitação das diferenças de cor analisados pelo sistema STD. Doze profissionais de odontologia (quatro de cada um dos seguintes grupos: dentistas, auxiliar de consultório dentário, prótese e técnicos) e quatro pacientes foram avaliados. As diferenças de cor do dente (ΔE) foram medidos em cada um dos três eixos principais de espaço de cor CIELAB. Não houve diferenças entre os indivíduos dos grupos. Análise dos dados com base no SDT, que leva as taxas de um resultado falso, com alterações maiores.

Costa e Silva et al (2009) avaliaram in vitro a estabilidade de cor de resinas compostas quando expostas a bebidas com teores elevados de coloração da região amazônica. 240 amostras de quatro marcas diferentes compostos de matiz A3 foram confeccionadas em uma matriz de acrílico. A cor inicial foi registrada e em seguida as amostras

foram divididas em quatro grupos ($n = 15$): G1 (café), G2 (suco de açaí), G3 (guaraná energético) e G4 (controle - água destilada). As amostras foram expostas a soluções de DES (6HS) e RE (18hs). As amostras foram imersas nas soluções de coloração para 15 minutos diários. Após 7 dias, 15 e 30, novos registros fotográficos foram feitos. As imagens foram analisadas utilizando Corel PHOTO-PAINT 12 software para identificar as cores através do sistema HSB. O teste de Kruskal-Wallis e testes t ($p < 0,05$) demonstraram diferenças significativas na cor (matiz, saturação e brilho). Os resultados revelaram que nenhum dos compostos testados apresentaram estabilidade de cor quando expostos a soluções de coloração, e que a região amazônica bebidas mostrou-se menos coloração mais café.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

O delineamento desta pesquisa é do tipo prospectivo, primário e experimental, para avaliar citotoxicidade e alteração de cor em dentes humanos das emulsões a base do óleo de copaíba e suspensão de própolis

4.2 Considerações éticas

A pesquisa foi realizada em Manaus, na Universidade Federal do Amazonas, no Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia e no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. A metodologia da pesquisa consiste em avaliar a citotoxicidade e a alteração de cor dos dentes humanas de acordo com o tempo de aplicação das emulsões a base do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e suspensão de própolis. Foram necessários 90 dentes humanos hígidos selecionados aleatoriamente, extraídos por razões ortodônticas. O projeto foi aprovado sobre o CAAE- 0312.0.115.000-08 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM conforme o parecer em anexo.

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos elementos dentários hígidos (dentes livres de cárie e/ou restaurações), extraídos por razões ortodônticas, sendo terceiros molares erupcionados, provenientes de pacientes de idade e gênero aleatórios.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos elementos dentários que apresentaram cárie, restaurações, trincas ou fraturas.

4.5 Benefícios

A produção de soluções de lavagem de cavidades à base óleo de copaíba e de própolis viabilizará sua utilização durante os procedimentos restauradores. Devido às propriedades antimicrobianas, acredita-se que essa solução poderá contribuir na diminuição da incidência de cárie recorrente através da diminuição da quantidade dos microrganismos presentes na cavidade antes da inserção do material restaurador. Além disso, proporcionará a comprovação da eficácia de um fitoterápico da biodiversidade Amazônica e a possibilidade de sua introdução na Odontologia.

4.6 Riscos

A utilização de elementos dentários extraídos não implicou em nenhum risco ao paciente, uma vez que os dentes foram removidos da arcada dentária por razões ortodônticas ou cirúrgicas.

4.7 Avaliação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos Humanos

Esta metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Malpezzi et al (1993), e permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

Para obtenção da solução de eritrócitos humanos, coletou-se cerca de 3 mL de sangue venoso em tubo contendo citrato, centrifugou-se, retirou-se o plasma e, do concentrado de

hemácias foi transferido 1 mL para uma proveta contendo 99 mL de solução fisiológica 0,9 %, obtendo-se então uma solução de eritrócitos a 1%.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades, em que em cada poço foi adicionado 30 μ L da substância diluída em salina e 270 μ L de suspensão de eritrócitos. As substâncias foram testadas nas concentrações de 10 μ L/mL. Para controle positivo foi utilizado o Triton X (que corresponde a indução de 100% de hemólise) e para controle negativo utilizou-se somente salina.

Incubou-se a placa por uma hora a 37°C e, depois centrifugou-se a mesma a 1500 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para outra microplaca de 96 poços para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 540 nm. A atividade da substância teste foi determinada comparando-se aos controles positivo e negativo.

4.8 Teste de Cultura de Células

A citotoxicidade dos produtos foram testados contra (fibroblastos murinos) NHI3T3, através do ensaio de Alamar BlueTM (AHMED et al, 1994). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina, e incubados a 37 ° C, com uma atmosfera de 5% de CO₂.

Após as células cultivadas terem atingido uma confluência entre 70 a 100% ocorreu o processo de tripsinização e a contagem das mesmas em câmara de Neubauer. Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços (2,5 x 10⁴ células/ 100 μ L /poço), durante 24 h, período necessário para que ocorra a adesão das células na placa, a 37° C,

com uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, 100µL *dos produtos* foram adicionados a cada poço, na concentração de 5 µL/mL, e as células incubadas durante 72 h, nas mesmas condições ambientes.

Os poços controles positivos receberam somente meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata. Três horas antes do final da incubação, 10 µL de Alamar Blue™ 0,02% foi adicionado a cada poço. O sinal de fluorescência foi monitorada através de um leitor multiplaca usando comprimento de onda de excitação 530-560 nm e 590 nm de comprimento de onda de emissão. O sinal fluorescente gerado a partir do ensaio foi proporcional ao número de células vivas na amostra, de acordo com o ensaio.

4.9 Influência do Tempo de Aplicação das Substâncias Testes na Alteração de Cor dos Dentes Humanos

4.9.1 CONFECÇÃO DE CORPOS DE PROVA

A confecção dos corpos de prova seguiu a metodologia proposta por Araújo et al (1998). Para este estudo, foram utilizados 90 dentes humanos extraídos por razões ortodônticas e/ou cirúrgicas para a confecção de 180 corpos-de-prova. Após a extração, os dentes foram armazenados em timol 2% por um período mínimo de 24 horas, a fim de descontaminá-los. A coroa foi separada da raiz ao nível da junção amelo-cementária, com o auxílio de uma cortadeira (PRESI Mecatome, Grenoble-France, p100) ajustada com disco de diamante dupla face (Figura 01 e 02). O segundo corte foi para a secção da coroa no sentido méso-distal, obtendo-se dois corpos de prova a cada dente seccionado. Cada corpo de prova foi armazenado em recipientes individuais contendo água deionizada e mantido a temperatura de ±37 °C.



Figura 01 – dente posicionado na cortadeira com disco de diamante



Figura 02- secção a cora da raiz do dente

Os corpos-de-prova foram distribuídos de acordo com os seguintes grupos experimentais:

- Grupo I- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão de copaíba 10% nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo II- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão de copaíba 30% nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo III- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão de copaíba 10% + A nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo IV- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão de copaíba 30% + A nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;

- Grupo V- 10 corpos-de-prova imersos na suspensão de extrato aquoso de própolis 1% nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo VI (Controle)- 10 corpos-de-prova imersos na solução de clorexidina a 2% nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;

4.9.2 IMERSÃO DOS CORPOS DE PROVA NAS SOLUÇÕES TESTES

Os corpos de prova foram imersos nas substâncias testes durante 10 segundos, 30 segundos ou 10 minutos de acordo com os grupos experimentais.

4.9.3 LEITURA DE COR

Anteriormente ao tratamento foi realizada a leitura da cor dos dentes no tempo inicial (T_0) de cada corpo de prova. A cor foi determinada através dos parâmetros do sistema CIE lab ($L^* a^* b^*$), no qual L^* indica a luminosidade onde a média varia de 0 (preto) para 100 (branco) e o a^* e b^* o matiz, sendo que o a^* representa a saturação no eixo vermelho-verde e o b^* a saturação no eixo azul-amarelo. A comparação da alteração de cor dos dentes antes e após as substâncias testes foi dada pela diferença de cor que foi representada pela equação:

$$\Delta E^*_{ab} = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{0.5} \text{ onde:}$$

$$\Delta L^* = L^{*1} - L^{*0} \quad (\text{leitura após o uso da solução menos a leitura prévia})$$

$$\Delta a^* = a^{*1} - a^{*0} \quad (\text{leitura após o uso da solução menos a leitura prévia})$$

$$\Delta b^* = b^{*1} - b^{*0} \quad (\text{leitura após o uso da solução menos a leitura prévia})$$

Foi utilizado para a mensuração objetiva da cor o aparelho VITAEasyshade (Easyshade®, Vivadent, Brea, CA, USA), (Figura 03).



Figura 03: espectrofotômetro

FONTE: <http://www.wilcos.com.br/vita_easyshade_compact.php>

acesso: 14/07/2011

4.9.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas foi calculada utilizando a mediana e os quartis (Q_i), pois os dados não apresentavam distribuição normal ao nível de 5% de significância. Na comparação das medianas foi aplicada a estatística de teste de *Kruskal-Wallis* para comparação nos diferentes grupos e *Mann-Whitney* para a comparação de duas medianas (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info 3.5.3 para Windows desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC (www.cdc.gov/epiinfo). O nível de significância fixado para aplicação dos testes foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos Humanos

A atividade hemolítica em eritrócitos humanos demonstraram que a suspensão aquosa de própolis a 1% e seus veículos (água e tween 80) não apresentaram atividade hemolítica proporcionando uma média de 14,04% (DP \pm 5,52%) e 7,42% (D P \pm 3,77%) de lise celular, respectivamente.

A emulsão de copaíba nas diferentes concentrações, 10% e 30%, apresentaram atividade hemolítica proporcionando 99,11% (DP \pm 24,61%) e 120,48% (DP \pm 27,29%), respectivamente, de lise celular.

A copaíba *in natura* e seus veículos não apresentaram hemólise proporcionando 4,38% (DP \pm 4,61%) e 6,98% (DP \pm 2,99%) de lise celular, respectivamente.

5.2 Teste de Cultura de Células

Os resultados da cultura de células das emulsões da copaíba e suspensão de extrato aquoso de própolis a 1% estão expressos nos gráficos 01 e 02 respectivamente.

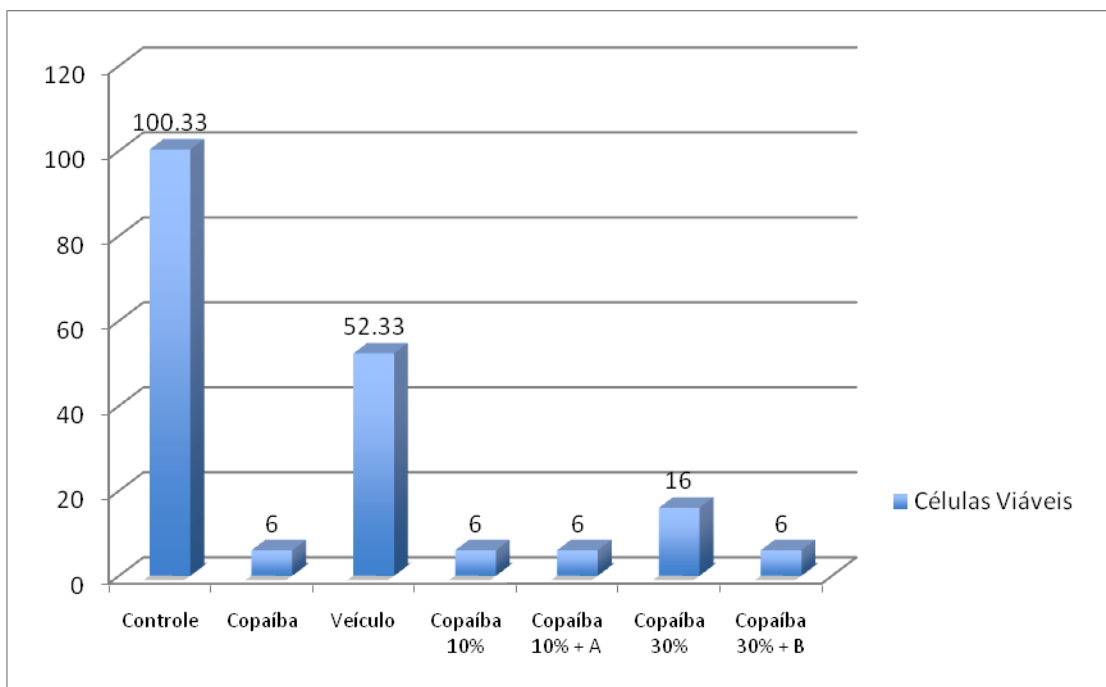


Gráfico 01 – Percentagem da viabilidade celular das emulsões de copaíba

O gráfico 01 demonstra que o óleo de copaíba *in natura* reduziu a viabilidade celular em 94%. As emulsões de copaíba a 10% com e sem A e a emulsão de copaíba a 30% com A a 1% reduziram a viabilidade celular semelhante ao óleo *in natura*. A emulsão de copaíba a 30% sem A apresentou maior viabilidade celular (84%).

Os resultados da cultura de células da suspensão do extrato aquoso de própolis 1% estão expressos no gráfico 02.

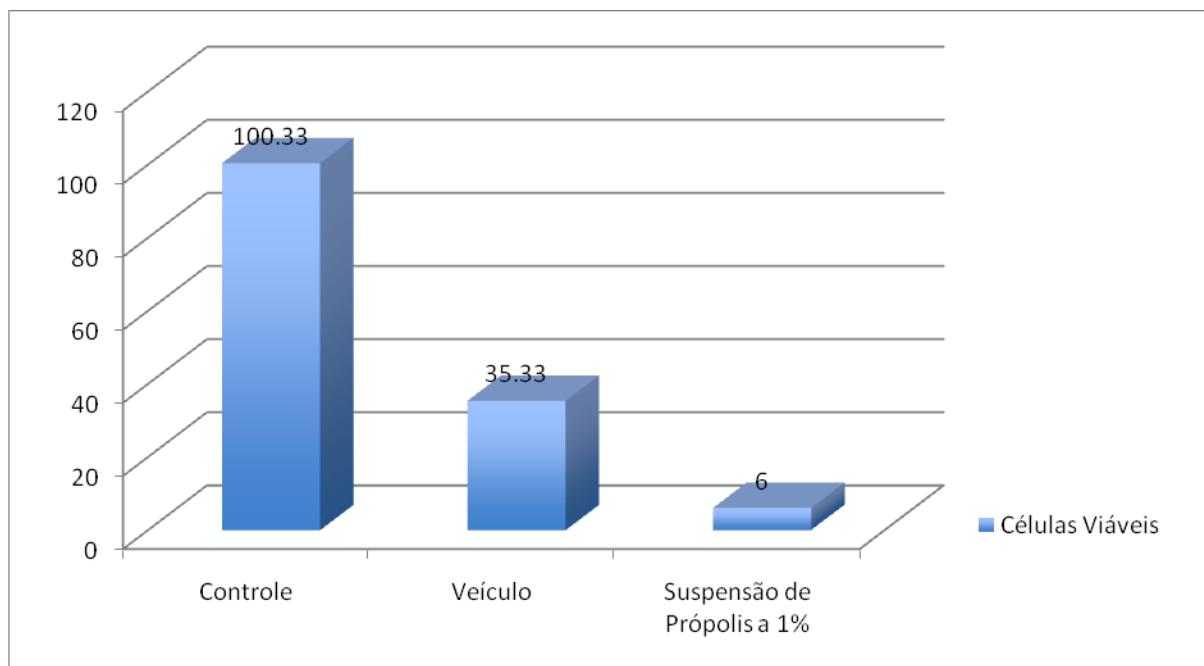


Gráfico 02- Percentagem da viabilidade celular da suspensão do extrato aquoso de própolis a 1%.

O gráfico 02 demonstra que a suspensão de própolis a 1% reduziu a viabilidade celular em 94%.

5.3 Influência do Tempo de Aplicação das Substâncias Testes na Alteração de Cor dos Dentes Humanos

Os resultados do teste de alteração de cor das emulsões de copaíba nas diferentes concentrações e da suspensão de própolis estão expressos nos gráficos 03, 04 e tabela 1.

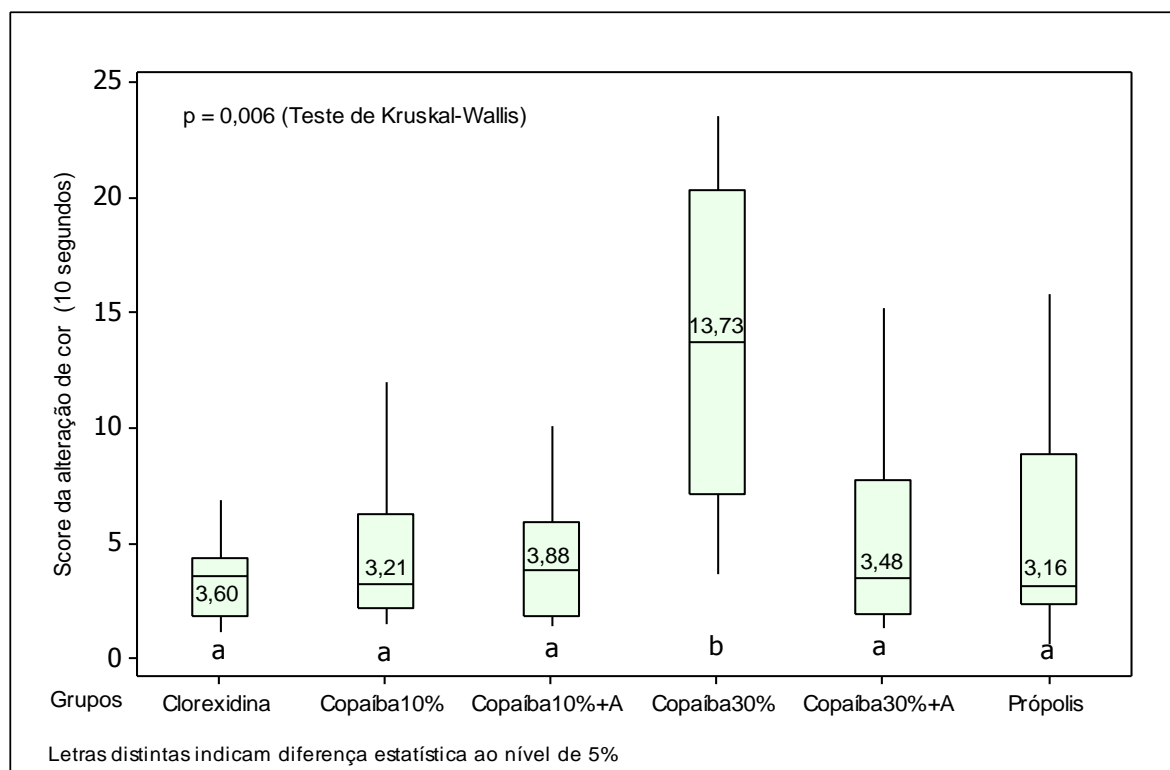


Gráfico 3. Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 segundos das soluções testes em dentes humanos, Manaus – AM.

O Gráfico 3 demonstra que no período de 10 segundos os grupos experimentais da Clorexidina, Copaíba a 10%, Copaíba a 10% + A, Copaíba a 30% + A e a própolis não apresentaram diferença estatística significativa entre si na alteração de cor dos dentes humanos (ΔE). A emulsão de Copaíba a 30% apresentou maior alteração de cor dentes humanos (ΔE) em relação aos grupos experimentais sendo significativamente diferente.

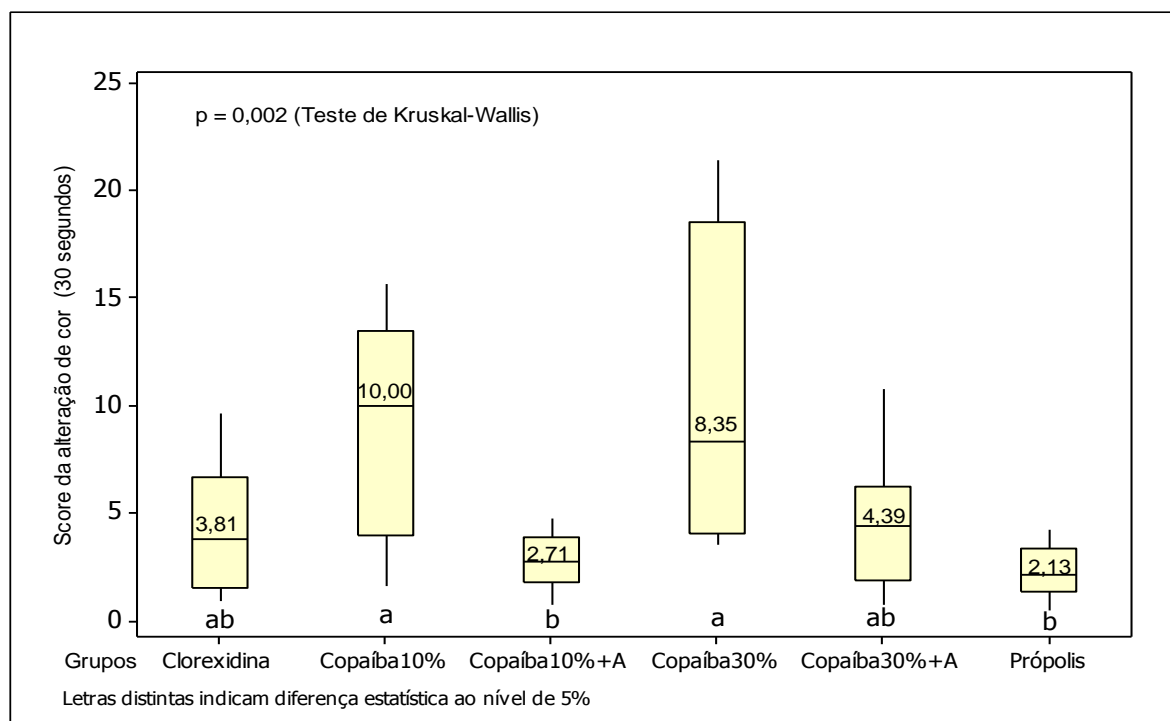


Gráfico 4. Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 30 segundos das soluções testes em dentes humanos, Manaus – AM.

O gráfico 4 demonstra que no período de 30 segundos os grupos experimentais da Copaíba a 10% + A e a própolis apresentaram menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) sendo semelhantes entre si. A clorexidina e a copaíba a 30% + A foram semelhantes entre si. A copaíba a 10% e a 30% apresentaram maior alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) e foram semelhantes entre si $p \leq 0,05$.

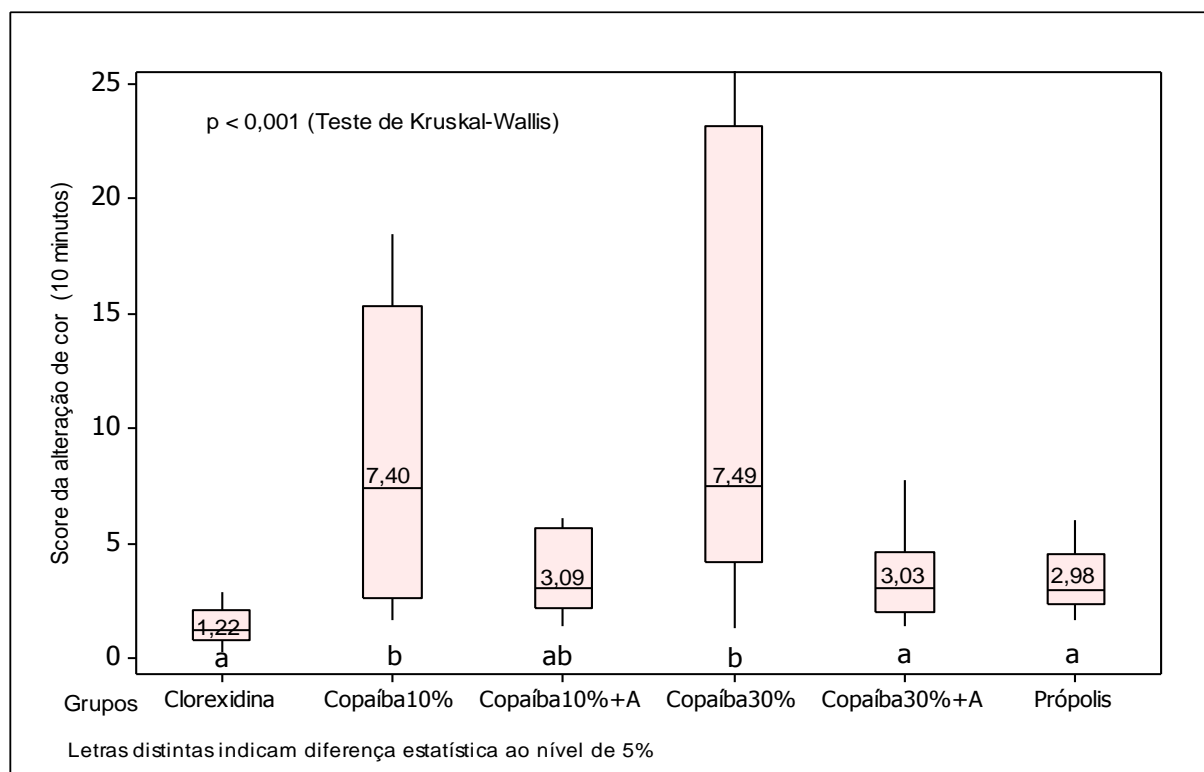


Gráfico 5. Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 minutos das soluções testes em dentes humanos, Manaus – AM.

O gráfico 5 demonstra que no período de 10 minutos os grupos experimentais da Clorexidina, Copaíba a 30% + A e a própolis apresentaram menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) sendo semelhantes entre si. A copaíba a 10% e a 30% apresentaram maior alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) e foram semelhantes entre si. A copaíba a 10%.+ A foi semelhante a todos os grupos experimentais, apresentando, no entanto, menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) em relação a copaíba a 10% e a 30% $p \leq 0,05$.

Grupos	Score						p*
	10 segundos		30 segundos		10 minutos		
	Med	Q ₁ /Q ₃	Med	Q ₁ /Q ₃	Med	Q ₁ /Q ₃	
Clorexidina	3,60 ^a	1,93/4,32	3,81 ^a	1,51/4,68	1,22 ^b	0,85/1,80	0,009
Copaíba 10%	3,21	2,24/6,11	10,00	3,98/12,72	7,41	2,66/14,69	0,059
Copaíba 10% + A	3,88	1,96/5,66	2,70	1,97/3,57	3,08	2,20/5,52	0,703
Copaíba 30%	13,73	7,28/20,12	8,35	4,05/17,87	7,49	5,12/21,86	0,532
Copaíba 30% + A	3,48	2,08/6,19	4,39	2,12/5,62	3,03	2,04/4,06	0,802
Própolis	3,16	2,53/8,32	2,13	1,58/3,00	2,98	2,32/4,09	0,145

* Teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*; Med = Mediana; Q_i = quartis. Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Tabela 1. Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10, 30 segundos e 10 minutos das soluções testes em dentes humanos, Manaus – AM.

A tabela 1 demonstra que nos períodos experimentais todas as substâncias testes apresentaram alteração de cor nos dentes humanos (ΔE), sendo que a clorexidina foi a única que apresentou diferença estatística significativa $p \leq 0,05$.

Comparando os grupos experimentais nos períodos foi verificado que em 10 segundos a copaíba a 10% e a própolis apresentaram menor a alteração de cor nos dentes humanos (ΔE). No período de 30 segundos foram a copaíba a 10% + A e a própolis e em 10 minutos essa alteração foi verificada na clorexidina, copaíba a 10% + A, copaíba a 30% + A e na própolis.

6. DISCUSSÃO

Inúmeras plantas medicinais têm sido utilizadas sem bases científicas sólidas que demonstrem sua eficiência e segurança (FACURY et al, 2004).

Existem poucas pesquisas científicas sobre testes de compatibilidade biológica utilizando fitoterápicos, visando eliminar a possibilidade de efeitos locais ou sistêmicos no homem. Esse fato estimulou a realização desta pesquisa com objetivo de analisar a citotoxicidade de produtos da biodiversidade amazônica e alteração da cor em dentes humanos visando uma possível introdução na odontologia.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é um sistema biológico onde os materiais testes demonstram o efeito direto em cultura de células. As vantagens dessa metodologia são: o controle ambiental das células, a facilidade, rapidez na execução e baixo custo (MARTINS, 2005).

O teste de cultura de células mostrou que todas as formulações foram tóxicas ocasionando a diminuição da viabilidade celular.

A avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos demonstrou que a suspensão aquosa de própolis a 1% e seus veículos não apresentaram atividade hemolítica.

A emulsão de copaíba nas diferentes concentrações, 10% e 30%, apresentaram atividade hemolítica. A copaíba *in natura* e seus veículos não apresentaram hemólise.

Os resultados acima relatados da suspensão aquosa de própolis a 1% e da copaíba *in natura* e seus veículos não causaram lise celular nos eritrócitos, portanto estas substâncias poderão ser consideradas dentro do padrão aceitável de citotoxicidade.

Esses resultados divergiram dos resultados de Almeida (2008) ao analisar a atividade hemolítica em eritrócitos humanos utilizando extratos etanólicos de própolis. Este estudo é continuação dos resultados apresentados por Almeida (2008) demonstrando evolução das pesquisas em andamento podendo, no futuro, apresentar potencialidade de uso tópico como agente de limpeza de cavidades. Ressalta-se que ainda há necessidade de mais estudos e aperfeiçoamento da formulação para atingir os objetivos propostos.

Associando os resultados da cultura de células e os resultados da hemólise em eritrócitos humanos sugere-se que a toxicidade na cultura de células possivelmente não está relacionada à lise celular e sim a outra etiologia presentes nas soluções testes que necessita de investigação.

Apesar da alta toxicidade na cultura de células da própolis e do óleo de copaíba, existem vários estudos demonstrando as atividades biológicas destas substâncias, tais como: antibacterianos, antiinflamatórias, antisséptica, cicatrizante e antitumoral para a copaíba (BANDEIRA, et al. 1999) e para a própolis atividade antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK et al., 2000;Ishida,2011). Os resultados destas pesquisas e das que estão em andamento reforçam a hipótese da correlação da alta citotoxicidade com a existência de alguma atividade biológica dos produtos analisados.

O veículo utilizado na formulação das emulsões e suspensão foi o Tween, que é um surfactante não-iônico, tóxico para as membranas biológicas, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol.O Tween utilizado como veículo foi tóxico na cultura de células, isto possivelmente está relacionado a sua capacidade de alterar a morfologia e a superfície da parede celular devido a sua ação detergente, contribuindo para o resultado tóxico das emulsões e suspensão (DOMINGUES et al. 2000).

Da Silva et al (2008) concordaram que a cor do dente é um fenômeno complexo, no qual a percepção total é influenciada por vários fatores como condições de iluminação, translucidez, opacidade, brilho, e limitações do olho e cérebro humano. Também afirmaram que um dente é composto de camadas estratiformes e semitranslúcidas de esmalte e dentina que absorvem, refletem, transmitem, ou refratam parte da luz incidente, assim produzindo a cor do dente.

Os espectrofotômetros têm grandes vantagens sobre as escalas de cor, pois a leitura de cor é objetiva, repetível, quantificável e rapidamente obtida (JOINER, 2004). Os dados obtidos pelos espectrofotômetros não são totalmente a prova de erros, podendo sofrer alterações devido a dispersão da luz nas superfícies curvas dos dentes. Este fato delineou a padronização da metodologia deste estudo, onde foi confeccionado um dispositivo para acoplar a ponta do espectrofotômetro e posicionar os corpos de prova, visando a leitura na mesma região evitando a dispersão da luz.

Correlacionando os testes *in vitro* para *in vivo* simula realizar a leitura da cor da dentina em cavidade classe V em um incisivo anterior, devido a confecção dos corpos de prova no sentido mésio distal. Outro cuidado delineado nesta metodologia foi a obtenção de superfícies lisas durante o corte dos dentes com disco de diamante.

Considerando que as propriedades ópticas da dentina determinam a cor do dente este estudo foi realizado em utilizando corpos de prova de dentina (TEN BOSCH et al. 1995).

Neste estudo, a cor dos corpos de prova foi mensurada utilizando o espectrofotômetro *Vita Easy-Shade* (*Vita Zahnfabrik*, Alemanha), que automaticamente fornece os valores de L^* , a^* e b^* . Este método tem como vantagem a eliminação da subjetividade da análise, proporcionando resultados mais precisos. O Sistema CIE $L^*a^*b^*$ se baseia na teoria de

percepção de cor a partir em três diferentes receptores de cor nos olhos (vermelho, verde e azul), sendo atualmente considerado como um padrão internacional para mensurações de cor. Neste sistema existem três eixos ou coordenadas L , a e b , permitindo a definição numérica da cor e a diferenciação existente entre duas cores, através do cálculo matemático do ΔE (diferença de cor).

A vantagem do sistema CIE $L^*a^*b^*$ é que as diferenças de cor são expressas em unidades que podem ser relacionadas à percepção visual e significância clínica. (O'BRIEN et al, 2003).

Analisando os resultados no período de 10 segundos foi observado que todas as substâncias alteram a cor dos dentes humanos (ΔE) sendo semelhantes entre si que a copaíba a 30% apresentou maior alteração com significância estatística entre os grupos.

Comparando os períodos de 30 segundos e 10 minutos a copaíba a 10% e a 30% apresentaram maior alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) e foram semelhantes entre si. Em 30 segundos os grupos experimentais da Copaíba 10% + A e a própolis apresentaram menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) sendo semelhantes entre si, enquanto que em 10 minutos a Clorexidina, Copaíba a 30% + A e a própolis apresentaram menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) sendo semelhantes entre si.

Comparando os grupos experimentais em todos os períodos foi verificado que: em 10 segundos a copaíba a 10% ($\Delta E= 3,21$) e a própolis ($\Delta E= 3,16$) apresentaram menor a alteração de cor nos dentes humanos (ΔE); No período de 30 segundos foram a copaíba a 10% + A ($\Delta E= 2,70$) e a própolis ($\Delta E= 2,13$) e; em 10 minutos essa alteração foi verificada na clorexidina ($\Delta E= 1,22$), copaíba a 10% +A ($\Delta E= 3,08$), copaíba a 30% + A ($\Delta E= 3,03$)e na própolis ($\Delta E= 2,98$).

Analisando os resultados na perspectiva da clínica diária de percepção visual, os valores de ΔE igual ou menor que 3,3 é considerado clinicamente insignificantes, ou seja a alteração de cor dos dentes humanos seriam imperceptíveis clinicamente (LEONARD et al. 1998). Baseado nestes fatos as substâncias testes onde a alteração na cor dos dentes não seriam perceptíveis clinicamente foram: em 10 segundos a copaíba a 10% e a própolis; em 30 segundos a copaíba a 10% + A e a própolis e; no período de 10 minutos a clorexidina, a copaíba a 10% + A, copaíba a 30% + A e a própolis.

Estes resultados foram analisados seguindo o sistema e diagrama CIELAB (Figura 04) com a seguinte equação:

$$\Delta E^*_{ab} = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{0.5} \text{ onde:}$$

$$\Delta L^* = L^{*1} - L^{*0} \quad (\text{leitura após o uso da solução menos a leitura prévia})$$

$$\Delta a^* = a^{*1} - a^{*0} \quad (\text{leitura após o uso da solução menos a leitura prévia})$$

$$\Delta b^* = b^{*1} - b^{*0} \quad (\text{leitura após o uso da solução menos a leitura prévia})$$

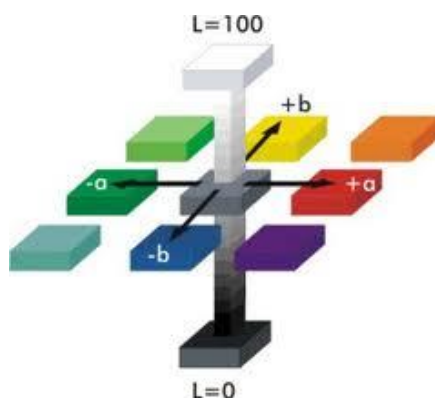


Figura 04: diagram do Espaço de cor CIELAB

Fonte: <www.cielab.com.au> acesso: 14/07/2011

Onde valor de L^* é a medida de luminosidade ou claridade de um objeto e é quantificado numa escala tal que o preto perfeito tem um valor de L^* igual a zero, enquanto que o branco total tem um valor de L^* igual a 100. Existem ainda dois componentes cromáticos que representam a variação de matiz e croma. Como luminosidade é o fator mais importante na determinação da cor, o aumento nos valores de L^* nos grupos Copaíba 30% + A e a Copaíba 10% + A nos períodos de 10 e 30 segundos e a própolis nos períodos de 30 segundos e 10 minutos revela que houve clareamento no uso dessas substâncias (Anexo 02), (TOUATI et al, 2000)

O eixo a^* é medido do avermelhado (a^* positivo) ao esverdeado (a^* negativo), variando respectivamente de +120 a -120. O valor de a^* após a imersão tornou-se positivo (tendência para o eixo vermelho) para todos os grupos no tempo de 10 segundos e tornou-se negativo (tendência para o eixo verde) para o grupo da Clorexidina no tempo de 30 segundos e Copaíba 10% no tempo de 10 minutos.

O eixo b^* é medido do amarelado (b^* positivo) ao azulado (b^* negativo), variando respectivamente de +120 a -120. Os valores negativos do b^* em todos os grupos expressam que houve uma tendência para o eixo da cor azul, a qual denota sensação de cor mais clara (LEONARD et al. 1998).

Estudos demonstraram que quando usado prolongadamente a clorexidina ocorre a pigmentação das superfícies dos dentes e da língua. Segundo Pontefract et al. (2004), essa pigmentação é devido à precipitação de produtos de interação da clorexidina com pigmentos oriundos dos alimentos, como café, chá e vinho nas superfícies orais.

A utilização da clorexidina no presente experimento, foi em forma de solução de limpeza de cavidades, tempo curto e em superfícies dentárias limpas justificando o não manchamento da estrutura dentária.

A utilização de um produto biotecnológico oriundo da biodiversidade amazônica para potencializar as emulsões de copaíba contribuiu significativamente para redução da alteração de cor das emulsões testadas expressos nos valores de ΔE . Entretanto não foi encontrado na literatura pesquisas que justifique a ocorrência desta alteração na cor dos dentes.

Esta pesquisa demonstrou que existe a viabilidade de utilização clínica das substâncias testes devido aos resultados apresentados principalmente na alteração de cor nos dentes humanos, necessitando de mais estudos na compatibilidade biológica, na farmacotécnica e nos ensaios de propriedades físicas e mecânicas.

7. CONCLUSÃO

Baseados na metodologia empregada foi possível concluir:

1. Todas as substâncias testes apresentaram toxicidade nos testes empregados, excetuando a suspensão de própolis no teste de hemólise, havendo necessidade de mais estudos de compatibilidade biológica e de farmacotécnica.
2. As substâncias testes apresentaram viabilidade de utilização, demonstrando que o tempo de aplicação pode interferir na alteração de cor dos dentes humanos. Analisando comparativamente pode-se inferir que a própolis apresentou melhor resultado independente do período experimental.

8 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Ma r	Abr	Mai	Jun	Jul
	Levantamento Bibliográfico	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	Coleta de Dados	√	√	√	√	√							
	Realização da fase experimental do teste de hemólise						√						
	Realização da fase experimental do teste de cultura de células							√					
	Realização do teste de alteração de cor em dentes humanos								√				
	Tabulação dos dados									√			
	Análise Estatística									√			
	Descrição dos resultados										√		
	Elaboração do Resumo e do Relatório Final										√	√	√
	Preparação da Apresentação Final para o congresso												X

√ atividades executadas.

9 REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALENCAR, S.M. et al. Composição química de *Baccharis drancunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Gerais. *Cienc.Rural*, v.35, n.4, Santa Maria, jul./ago. 2005.

ALMA -DOZIĆ, DDS; CORNELIS J. KLEVERLAAN; AHMED EL-ZOHAIRY, DDS; ALBERT J. FEILZER, DDS Performance of Five Commercially Available Tooth Color-Measuring Devices . *Journal of Prosthodontics*, Vol 16, No 2 (March-April), 2007: pp 93-100.

ALMEIDA, M. Avaliação da Compatibilidade Biológica de Extratos Etanólicos da Própolis obtidos nos Apiários Amazonense em Tecido Conjuntivo Subcutâneos de Ratos. *CONIC XVII* (2008)

ALMEIDA, R. V. D. et al. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, v. 6, n. 1, jan./abr., p. 87-92, 2006.

ANDRÉA, M. V; COSTA, C. N; CLARTO, L. Própolis na cura e prevenção de doenças? Pode ser uma boa alternativa!. Bahia Agric. v.7, n.1, set, 2005.

ARAÚJO, M. A. J. et al. Avaliação qualitativa do efeito de agentes de limpeza na camada de lama dentinária: estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de varredura. Rev Odontol Univ. São Paulo, v. 12, n. 2, p. 99-104 abr./jun, 1998.

AUTIAN, J. General toxicology and screening tests for dental materials. Int. Dent. J., v.24, p. 235, 174.

AZEVEDO, I. B. S et al. Tratamento das escaras de decúbio com própolis. Ver.bras.enferm, v. 39, n.2/3, abr.-set., p. 7-33,1986.

BANDEIRA MFCL, OLIVEIRA MRB, PIZZOLITO AC, BENATTI- NETO C, JORGE-NETO J 1999b. Estudo farmacológico preliminar de Copaifera multijuga (óleo de copaíba). J Bras Clin Estet Odontol 3: 39-41.

BIACHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitogênicas. Scientia Agricola, Piracicaba. v.55, n.1. Jan. / Apr, 1998.

BUSATO, A.L.S. **Dentística: Restaurações estéticas**. São Paulo: Artes Medicas, 2002.

CANEPPELE, T F, SOUZA, A C; VALERA, M C, PAGAN, C .Influência da embebição dental em substâncias com corantes na eficácia do clareamento dental com peróxido de carbamida a 16%. Arquivos em Odontologia Volume 45, Nº 04 Outubro/Dezembro de 2009.

CARDOSO, PC, GODOY FS, OLIVEIRA MT, BARATIERI. um estudo in vitro influência do tempo de aplicação de um gel clareador a base de peróxido de carbamida a 10% na cor dos dentes - Cienc Odontol Bras 2007 jan./mar.; 10 (1): 78-83.

COSTA-E-SILVA, D., TIRADENTES, S. B. S. P., PARENTE, R. C., MELLO, J. A. N., BANDEIRA, M. F. C. L. Color change using HSB color system of dental resin composites immersed in different common Amazon region beverages. Acta Amazonia. Vol. . 39(4) 2009: 961 – 968.

CRUZ AS, FIGUEIREDO CA, IKEDA TI, VASCONCELOS ACE, CARDOSO JB, SALLES-GOMES LF. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade "in vitro" de materiais biocompatíveis Rev. Saúde Pública vol. 32 no. 2 São Paulo Apr. 1998.

DA SILVA ,JD; PARK , S; WEBER, HR; ISHIKAWA-NAGAI, S. Clinical performance of a newly developed spectrophotometric system on tooth color reproduction. Journal of Prosthetic Dentistry Volume 99, Issue 5 , Pages 361-368, May 2008.

DAUGSCH, A. et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica, site acessado: www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo/htm, em 29 de junho de 2007.

DI STASI, L. C. Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

DOMINGUES FC, QUEIROZ JA, CABRAL JM, FONSECA LP. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:394-401.

EPI-INFO, Versão 3.5.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, site: www.cdc.gov/epiinfo, acessado no dia 10 de julho de 2011, as 22:45h.

FACURY NETO, MA, FACUNDES DJ, BELETTI ME, NOVO NF, FERREIRA JY, PENHA-SILVA N. Systematic use of *Solidago microglossa* dc in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. *J. Morhol. Sci.* 2004; 1 (4): 207-210.

FEJERSKOV, O. KIDD, E. Cárie dentária – A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos, 2005. 71p.

FERNANDES JR. A et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.7, n.2, dez. 2001.

FERNANDES JR. et al. in vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 1, n. 2, 1995.

FERREIRA LA 1999. Potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*): um estudo de caso na Floresta Estadual do Antimary, Acre. São Carlos, 54 p. Dissertação de Mestrado, Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.

FONDRIEST, J. Shade Matching in Restorative Dentistry: The Science and Strategies. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. Volume 23, Number 5, 2003.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A.; Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre o *S. mutans*, *S. sobrinus*. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, v. 10, n.4, out/dez, p. 251-256, 1996.

GERALDINI, C. A; SALGADO, E. G. C; RODE, S. M; Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária – avaliação ultra-estrutural, *Pós-Grad Ver. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v. 3, n. 2, p. 37-42, jul/dez, 2000.

GHISALBERTI, S. L. Própolis: a review. *Bee World* , n.60, p. 59-84,1979.

GRÉGIO, et al. Efeito da própolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. *Estud. Biolog.*, v. 27, n. 58, jan/mar., 2005.

HERRERA D, ROLDÁN S, SANTACRUZ I, SANTOS S, MASDEVALL M, SANZ M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0,12% chlorexidine muo thrinse

formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol.* 2003;30:307-14.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. Biological evaluation of dental materials. Genève, 1984, 54p. (ISO/Technical Report 7405)

JOINER, A. Tooth colour: a review of the literature. *Journal of Dentistry.* 32, 3–12, 2004.

JORGE, A.O.C. *Microbiologia Bucal*, Ed. Santos. São Paulo: 2007 p. 72.

LEITE A 2001. *Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba*. Rio Branco: Universidade Federal do Acre. 38 p.

LEONARD RH, SHARMA A, HAYWOOD VB. Use of different concentrations of carbamide

LINDSEY, D. T.; WEE, A. G. Perceptibility and acceptability of CIELAB color differences in computer-simulated teeth. *journal of dentistry* 35 (2007) 593 – 599.

LONGHINI et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev. Bras. Farmacologia*, v. 17, n. 3, p. 388-395, Jul/Set, 2007.

MALPEZZI, E. I. L.A.; FREITAS, J. C.; MURAMOTO, K.; KAMIYA H.. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*. v. 31 n.7 p. 853-864,1993.

MARTINS MD, MARQUES MM, BUSSADOR SK, AGNELI R. Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira e arnica paulista. *ConSctentae Saúde*, 2009; 8 (1): 99-104.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.3, p. 405-411, jul./set.,2005.

MONDELLI, J. Fundamentos de dentística operatória. São Paulo: Santos, 2006. 343p.

O'BRIEN WJ, HEMMENDINGER H, BOENKE KM, LINGER JB, GROH CL. Color distribution of three regions of extracted human teeth. *Dent Mater*. 1997;13:179-85.

PARK, Y. K et al. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. *Revista Mensagem Doce*, v.56, maio, 2000.

PARK, Y. K et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, n. 3, Campinas Ago./Out. 1998.

PARK, Y. K et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 32, n. 6, p.997-1003,

PEQUENO, M. N.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, n.1, p. 45-48, 2006.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova*, v.25, n.2, maio, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, J. C.; MONDELLI, J.; ISHIKIRIAMA, A. *Proteção Do Complexo Dentinopulpar*. 1 ed. São Paulo, sp: Editora Artes Médicas, 1998, v. 1. 316p.

peroxide for bleaching teeth: an in vitro study. *Quintessence Int.* 1998;29:503-7.

PÊSSOA, H. L. F. et al. Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxicos e espermolítico de *Poemacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda). *Ver.bras.farmacology*, João Pessoa, v.17, n.1, jan./mar.,2007.

PINTO, M S et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz.J.vest.Res.anim.Sci,São Paulo*, v.38, n.6, p. 278-283, 2001.

PLOWDEN C 2003. Production ecology of copaíba (*Copaifera* spp) oleoresin in the Eastern Brazilian Amazon. *Econ Bot* 57: 491-501.

PONTEFRACHT H, COURTNEY M, SMITH S, NEWCOMBE RG, ADDY M. Development of methods to enhance extrinsic tooth discoloration for comparison of toothpastes: two-product clinical study. *J Clin Periodontol.* 2004;31:7-11.

RODE, S. M; SANTOS, J. F. F. Limpeza cavitária - remoção da camada de "smear". Revista Brasileira de Odontologia, v. 47, n. 5, p.46-51, 1990.

ROGERO, AB; IKEDA TI, CRUZ, AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias Mat. Res. vol.6 no.3 São Carlos Apr./June 2003.

SOARES JG, VAREÃO MJC, WOLTER FILHO W, MOURÃO AP, CRAVEIRO AAR, ALENCAR JC 2003. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de Copaifera. Acta Amazonica 9: 65-59.

TEN BOSCH J.J, COOPS J.C. Tooth Color and Reflectance as Related to Light Scattering and Enamel Hardness. January 1995 vol. 74 no. 1 374-38

TOUATI B, MIARIA P, NATHANSON D. Odontologia Estética e restaurações cerâmicas. Trad. Sérgio Lian B. Martins. São Paulo: Santos; 2000. p. 61-115.

UZEL, A et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. Microbiological Research, v.160, p. 189-195, 2005.

VALDEVITE, L. M. Estudo do efeito in vitro de extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre fatores de virulência de Streptococcus mutans, relacionado a cárie dental. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto;

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R.; Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis, *Ciênc. Rural*, v.34, n.1, jan/fev , 2004.

VEIGA JR VF, ZUNINO L, CALIXTO JB, PATITUCCI ML, PINTO AC 2001. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytother Res* 15: 476-480.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. O Gênero *Copaifera*. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. , 2002.

VIEIRA, Sonia – *Bioestatística, Tópicos Avançados* – Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

WOISKY, R. G; GIESBRECHT, A. M; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. *Rev. farm. bioquim. Univ. São Paulo*, v.30, n.1, jan.-jun., p. 19-21, 1994.

YUNES RA, CECHINEL FV 2001. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes RA, Calixto JB (eds.). *Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos. p.17-46.

ANEXOS



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEPUFAM com CAAE nº. 0312.0.111.000-08, intitulado: "Biorresistência em Odontologia: estado estabotômico, atividade antibacteriana e compatibilidade biológica de soluções para limpeza de cavidades", tendo como Pesquisadora Responsável Maria Fulgêncio Costa Lima Bandeira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus - EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 30 de setembro de 2009.



Prof. Dr. David Lopes Neto
Coordenador CEPUFAM

ΔE_{10} segundos : Substancia ***ΔE = diferença de cor entre T0 (leitura inicial) e T1 (Leitura final)***

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	1,1874	1,9339	3,5977	4,3174	6,9123
Copaíba10%	1,4765	2,2450	3,2077	6,1164	12,0108
Copaíba10%+A	1,4491	1,9647	3,8757	5,6604	10,1143
Copaíba30%	3,7121	7,2801	13,7315	20,1209	23,5128
Copaíba30%+A	1,3416	2,0833	3,4771	6,1927	15,2381
Propólis	0,6164	2,5298	3,1543	8,3223	15,8316

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 16,3311

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0060

 L_{010} segundos : Substancia ***L_0 = coordenada da luminosidade inicial***

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	44,9000	48,9000	62,8500	65,3000	69,9000
Copaíba10%	36,5000	41,7000	45,1500	48,4000	63,6000
Copaíba10%+A	56,4000	59,7000	63,8500	69,9000	71,9000
Copaíba30%	42,6000	43,8000	52,4500	60,0000	64,0000
Copaíba30%+A	54,0000	58,7000	62,8000	68,7000	75,5000
Propólis	56,0000	64,4000	66,1000	72,2000	76,5000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 26,4245

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0001

 L_{f10} segundos : Substancia ***L_f = coordenada da luminosidade final***

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	41,7000	48,5000	60,0000	65,3000	68,6000
Copaíba10%	33,7000	38,2000	46,0000	49,5000	62,6000
Copaíba10%+A	54,1000	58,8000	64,7000	71,5000	77,1000
Copaíba30%	30,5000	36,3000	47,4500	56,1000	65,9000
Copaíba30%+A	51,2000	55,3000	61,6000	67,0000	76,5000
Propólis	49,3000	59,7000	63,7500	69,3000	87,0000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 22,1204

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0005

a0_10segundos : Substância

a0 = coordenada do eixo amarelo-azul inicial

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-3,7000	-1,5000	3,6000	6,0000	9,5000
Copaíba10%	1,6000	7,2000	7,5500	8,6000	8,8000
Copaíba10%+A	-3,7000	0,8000	1,4500	8,0000	9,9000
Copaíba30%	2,1000	2,5000	6,7000	8,2000	9,1000
Copaíba30%+A	-4,0000	0,1000	0,7000	9,4000	9,8000
Propólis	-4,5000	0,0000	0,6000	5,1000	7,1000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 10,5697

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0606

af_10segundos : Substância

af = coordenada do eixo amarelo-azul final

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-4,1000	-1,0000	4,2000	6,5000	7,4000
Copaíba10%	1,8000	6,6000	7,1000	8,4000	9,0000

Copaíba10%+A	-3,0000	1,2000	2,4500	8,6000	10,3000
Copaíba30%	2,4000	3,0000	4,5000	7,5000	11,0000
Copaíba30%+A	-1,5000	0,5000	2,8000	9,7000	10,9000
Propólis	-3,4000	0,2000	1,7000	5,9000	7,1000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 8,9006

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,1131

bo_10 segundos : Substancia

bo = coordenada do eixo verde-vermelho inicial

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	26,2000	32,9000	39,6000	49,8000	56,1000
Copaíba10%	36,7000	39,1000	40,2500	45,6000	46,7000
Copaíba10%+A	31,7000	34,7000	40,3500	50,5000	51,5000
Copaíba30%	32,5000	41,1000	42,2000	45,4000	45,6000
Copaíba30%+A	29,5000	33,6000	40,4500	47,9000	51,3000
Propólis	25,9000	29,5000	34,6000	45,0000	48,5000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 3,1792

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,6724

bf 10segundos : Substância

bf = coordenada do eixo verde-vermelho final

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	24,8000	34,4000	36,4000	46,5000	57,3000
Copaíba10%	35,1000	37,1000	38,9500	39,5000	43,7000
Copaíba10%+A	30,8000	35,4000	42,9000	48,7000	51,7000
Copaíba30%	27,7000	29,9000	37,4500	42,0000	47,6000
Copaíba30%+A	29,9000	30,9000	42,5000	49,4000	53,2000
Propólis	24,8000	33,1000	38,7500	44,7000	50,2000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 2,5841

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,7638

ΔL 10segundos : Substância

ΔL = diferença da luminosidade final menos a inicial

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-6,3000	-1,4000	-0,1500	0,5000	0,6000
Copaíba10%	-9,9000	-2,8000	-1,3000	1,9000	2,9000
Copaíba10%+A	-9,5000	-0,2000	1,6500	3,8000	5,5000
Copaíba30%	-22,5000	-14,9000	-5,9500	5,6000	10,1000
Copaíba30%+A	-13,8000	-5,5000	0,9000	1,5000	4,3000
Propólis	-11,2000	-5,4000	-2,4000	-1,3000	10,5000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 6,1825

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,2889

Δa 10s : Substância

Δa = diferença entre a coordenada do eixo amarelo-azul final menos o inicial

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-2,9000	-0,8000	0,1000	0,5000	1,1000
Copaíba10%	-1,3000	-0,3000	0,0000	0,2000	0,7000
Copaíba10%+A	-0,5000	-0,3000	0,4000	0,6000	2,3000
Copaíba30%	-4,3000	-2,8000	0,0500	1,8000	4,2000
Copaíba30%+A	0,1000	0,4000	0,7500	2,0000	4,0000
Propólis	-0,2000	0,1000	0,7500	1,3000	5,4000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 12,1585

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0327

Δb_{10s} : Substancia ***Δa = diferença entre a coordenada do eixo verde-vermelho final menos inicial***

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-4,2000	-3,3000	-2,5000	-1,0000	2,2000
Copaíba10%	-6,8000	-5,7000	-1,9000	-0,1000	1,2000
Copaíba10%+A	-4,6000	-2,2000	0,3500	1,5000	3,6000
Copaíba30%	-14,8000	-11,2000	-6,2000	-0,1000	10,7000
Copaíba30%+A	-6,0000	-0,1000	0,9500	1,7000	2,5000
Propólis	-2,2000	-0,6000	1,2500	3,7000	9,8000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 15,0604

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0101

 ΔE_{30s} : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	0,9220	1,5089	3,8109	5,6807	29,3508
Copaíba10%	1,5780	3,9812	10,0065	12,7165	31,6338
Copaíba10%+A	0,7071	1,9748	2,7079	3,5749	8,3247
Copaíba30%	3,5171	4,0546	8,3538	17,8762	21,3995
Copaíba30%+A	0,7483	2,1237	4,3887	5,6258	10,7303
Propólis	0,4472	1,5843	2,1300	3,0017	11,7686

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 18,6013

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0023

 Lo_{30s} : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	52,0000	55,8000	61,1500	68,8000	81,7000
Copaíba10%	39,0000	44,4000	56,9500	65,7000	82,9000
Copaíba10%+A	55,1000	59,2000	63,8000	66,7000	73,7000
Copaíba30%	39,1000	45,1000	53,9500	62,4000	69,0000
Copaíba30%+A	54,9000	58,8000	62,9500	65,4000	75,3000

Propólis 52,5000 60,2000 64,6500 69,2000 80,9000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 7,9913

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,1567

Lf 30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	47,7000	55,6000	61,3500	64,7000	69,5000
Copaíba10%	34,8000	37,6000	52,0500	58,8000	79,9000
Copaíba10%+A	57,3000	58,6000	65,1000	70,7000	75,6000
Copaíba30%	35,6000	40,0000	48,7000	56,0000	65,2000
Copaíba30%+A	51,4000	55,9000	62,7500	67,7000	78,7000
Propólis	50,7000	60,9000	63,9000	71,3000	83,3000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 17,7912

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0032

a0_30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-1,3000	-1,0000	0,6500	2,1000	10,7000
Copaíba10%	-2,6000	1,5000	5,9500	8,0000	8,2000
Copaíba10%+A	-3,4000	0,3000	1,1500	8,6000	10,2000
Copaíba30%	-0,7000	3,0000	3,7000	6,1000	10,5000
Copaíba30%+A	-3,8000	0,3000	0,7500	8,4000	9,6000
Propólis	-2,4000	1,0000	3,1000	6,0000	7,9000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 3,4003

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,6385

af_30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-1,9000	-1,3000	0,5000	1,9000	9,3000
Copaíba10%	-1,8000	2,3000	7,3000	7,6000	9,0000
Copaíba10%+A	-3,3000	1,9000	2,4000	9,1000	11,2000
Copaíba30%	-0,5000	3,7000	5,1000	6,4000	8,8000
Copaíba30%+A	-2,4000	0,5000	2,2500	9,4000	10,2000
Propólis	-1,2000	0,9000	1,8500	6,8000	8,7000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 5,6066

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,3464

b0_30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	29,0000	40,7000	42,1000	55,0000	58,8000
Copaíba10%	15,8000	38,9000	41,7000	46,6000	48,4000
Copaíba10%+A	28,4000	33,4000	41,1500	49,2000	52,5000
Copaíba30%	32,6000	34,6000	41,0000	43,7000	45,1000
Copaíba30%+A	26,2000	33,4000	38,9000	47,4000	51,8000
Propólis	28,0000	36,2000	37,8000	45,4000	52,2000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 4,1297

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,5309

bf_30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	37,0000	40,3000	45,7500	52,5000	54,9000

Copaíba10%	32,7000	35,6000	39,1500	46,5000	48,2000
Copaíba10%+A	32,4000	34,1000	40,0500	48,8000	51,5000
Copaíba30%	32,5000	35,1000	37,9000	39,0000	42,0000
Copaíba30%+A	29,9000	32,5000	40,3500	50,5000	52,7000
Propólis	31,3000	36,8000	38,7000	46,9000	51,2000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 8,2335

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,1438

ΔL 30s: Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-13,5000	-4,3000	-0,9000	0,6000	1,8000
Copaíba10%	-21,0000	-11,4000	-6,3000	-0,8000	14,2000
Copaíba10%+A	-1,4000	-0,3000	1,1000	2,2000	7,3000
Copaíba30%	-20,9000	-15,2000	-3,5500	2,0000	7,3000
Copaíba30%+A	-10,1000	-3,3000	1,5500	3,1000	4,0000
Propólis	-6,4000	-0,1000	0,6500	2,1000	2,4000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 9,7373

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0830

Δa _30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-1,6000	-1,3700	-0,6000	-0,3000	2,9000
Copaíba10%	-3,3000	-0,9000	0,5000	3,2000	4,1000
Copaíba10%+A	0,1000	0,5000	0,9000	1,2000	1,8000
Copaíba30%	-1,7000	-0,4000	0,1000	0,3000	3,3000
Copaíba30%+A	0,0000	0,2000	0,9000	1,8000	2,9000
Propólis	-1,5000	-0,6000	0,2500	0,6000	2,7000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 12,3049

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0308

Δb_30s : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-6,1000	-3,9000	-2,2500	0,2000	25,9000
Copaíba10%	-5,7000	-5,3000	-2,6000	0,9000	23,3000
Copaíba10%+A	-4,2000	-1,3000	0,3500	2,0000	4,0000
Copaíba30%	-10,0000	-8,7000	-2,3000	3,9000	5,9000
Copaíba30%+A	-3,2000	-0,6000	0,4000	3,1000	3,7000
Propólis	-1,0000	-0,5000	0,7500	1,9000	9,5000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 8,4501

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,1331

ΔE_10minutos : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	0,3000	0,8544	1,2197	1,8055	4,2214
Copaíba10%	1,6093	2,6571	7,4061	14,6905	18,4727
Copaíba10%+A	1,3491	2,2023	3,0844	5,5236	18,6987
Copaíba30%	1,2728	5,1196	7,4893	21,8616	34,0063
Copaíba30%+A	1,3565	2,0421	3,0331	4,0571	7,7627
Propólis	1,6310	2,3173	2,9808	4,0939	5,9808

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 22,0472

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0005

Lo_10m : Substância

Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
--------	-----	--------	-----	---------

Clorexidina	57,0000	57,1000	62,4000	63,4000	66,5000
Copaíba10%	50,0000	58,6000	65,8500	68,2000	73,3000
Copaíba10%+A	56,8000	59,5000	63,3500	71,2000	75,3000
Copaíba30%	41,2000	48,5000	52,5000	66,3000	76,4000
Copaíba30%+A	57,1000	59,4000	64,0500	72,5000	75,6000
Propólis	53,2000	59,5000	64,8000	69,5000	85,0000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 6,6119

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,2511

Lf_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	57,1000	57,6000	62,3000	63,6000	67,1000
Copaíba10%	47,4000	54,6000	62,6000	71,2000	75,0000
Copaíba10%+A	57,3000	59,4000	63,6500	67,9000	76,2000
Copaíba30%	22,1000	45,2000	49,8000	53,2000	74,0000
Copaíba30%+A	56,8000	61,4000	66,4000	68,2000	77,2000
Propólis	54,7000	58,4000	66,2000	70,0000	82,3000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 16,8233

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0048

a0_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-1,6000	-1,4000	0,9500	1,8000	7,7000
Copaíba10%	-4,2000	2,4000	4,5500	5,2000	9,2000
Copaíba10%+A	-2,8000	0,6000	1,5000	5,3000	10,3000
Copaíba30%	-1,1000	0,3000	2,2500	3,2000	10,0000
Copaíba30%+A	-3,6000	0,0000	0,4500	8,9000	9,3000
Propólis	-2,8000	0,0000	2,3000	4,6000	7,0000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 1,8280

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,8724

af_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-1,5000	-1,2000	0,9500	1,9000	8,1000
Copaíba10%	-4,3000	2,1000	3,7000	5,3000	9,0000
Copaíba10%+A	-1,8000	1,4000	2,5500	8,5000	10,8000
Copaíba30%	-0,1000	1,7000	3,7500	4,6000	8,2000
Copaíba30%+A	-1,6000	-0,1000	1,5000	9,5000	10,2000
Propólis	-3,7000	0,4000	1,5500	6,3000	8,1000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 2,7187

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,7433

bo_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	40,8000	41,1000	46,8500	52,3000	52,5000
Copaíba10%	25,5000	39,6000	44,3500	47,9000	50,7000
Copaíba10%+A	27,8000	33,7000	36,6500	45,7000	51,0000
Copaíba30%	34,2000	35,8000	36,8000	44,0000	44,7000
Copaíba30%+A	26,9000	33,2000	38,6000	46,5000	51,6000
Propólis	25,8000	31,7000	34,4000	44,1000	53,5000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 10,1103

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0722

bf_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	40,9000	41,4000	46,2000	52,7000	53,6000
Copaíba10%	24,5000	34,2000	40,7000	48,0000	50,1000
Copaíba10%+A	30,5000	35,3000	41,6000	48,0000	54,2000
Copaíba30%	20,4000	33,3000	36,5500	38,5000	41,7000
Copaíba30%+A	21,8000	34,0000	40,4500	48,7000	53,7000
Propólis	27,9000	33,8000	37,6500	46,4000	50,1000
de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)=					12,0030
Graus de liberdade =					5
Valor p=					0,0347

ΔL_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-2,0000	-0,6000	0,3500	1,0000	3,4000
Copaíba10%	-17,0000	-7,3000	-0,6000	4,6000	16,4000
Copaíba10%+A	-9,2000	-2,8000	0,8000	2,1000	3,9000
Copaíba30%	-26,2000	-21,1000	-5,1000	-1,1000	6,2000
Copaíba30%+A	-5,8000	-0,3000	1,4000	2,7000	3,8000
Propólis	-2,8000	-2,6000	1,1000	1,6000	2,0000
H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)=					5,4473
Graus de liberdade =					5
Valor p=					0,3638

Δa_10m : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-0,1000	0,0000	0,1000	0,2000	0,4000

Copaíba10%	-4,5000	-1,5000	-0,2000	1,8000	5,1000
Copaíba10%+A	-0,5000	0,2000	0,4000	1,0000	7,2000
Copaíba30%	-3,7000	-0,4000	0,7000	1,8000	4,6000
Copaíba30%+A	-0,2000	0,4000	0,8500	1,7000	2,0000
Propólis	-1,8000	-0,3000	0,5000	1,0000	2,0000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 5,6417

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,3427

Δb_{10m} : Substância

	Mínimo	25%	Median	75%	Maximum
Clorexidina	-2,1000	-0,1000	0,1500	0,6000	2,5000
Copaíba10%	-7,2000	-5,4000	-1,4500	-0,8000	3,2000
Copaíba10%+A	-2,2000	1,4000	2,1500	3,9000	14,6000
Copaíba30%	-24,3000	-4,8000	-1,7500	0,2000	5,6000
Copaíba30%+A	-5,1000	0,1000	0,7500	2,1000	2,6000
Propólis	-3,4000	-0,1000	1,3500	2,1000	5,1000

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 17,8012

Graus de liberdade = 5

Valor p= 0,0032